



Développement de nouvelles stratégies utilisant l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico-chimique des nitrocelluloses en vue de leur identification dans des prélèvements pré-ou post-attentat

Elodie Alinat

► To cite this version:

Elodie Alinat. Développement de nouvelles stratégies utilisant l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico-chimique des nitrocelluloses en vue de leur identification dans des prélèvements pré-ou post-attentat. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066489 . tel-01223004

HAL Id: tel-01223004

<https://theses.hal.science/tel-01223004>

Submitted on 1 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie analytique

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre (ED 388)

Développement de nouvelles stratégies utilisant l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico- chimique des nitrocelluloses en vue de leur identification dans des prélèvements pré-ou post-attentat

Présentée par Elodie ALINAT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue le 27 octobre 2014

Devant le jury composé de :

M. Hervé COTTET , Professeur, Université Montpellier 2	Rapporteur
M. François COUDERC , Professeur, Université Toulouse 3	Rapporteur
M. Dominique HOURDET , Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Président
Mme Nathalie DELAUNAY , Chargée de recherche CNRS	Examineur
M. Xavier ARCHER , Ingénieur principal, Préfecture de Police	Examineur
M. Pierre GAREIL , Professeur, Chimie ParisTech	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire Central de la Préfecture de Police de Paris (LCPP) et le Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM) de Chimie ParisTech et de l'ESPCI ParisTech.

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur Pierre GAREIL, mon directeur de thèse pour tout l'intérêt porté à ce projet, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et de son expérience et pour sa grande disponibilité. Je le remercie également pour son soutien moral lors des moments difficiles et pour tout le temps passé à la relecture de ce manuscrit.

Je souhaite vivement remercier Bruno FARGETTE, Pierre CARLOTTI et Xavier ARCHER du LCPP pour avoir financé cette étude et pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès. Je remercie également le Docteur Nathalie DELAUNAY pour ses conseils.

J'adresse mes remerciements aux Professeurs François COUDERC et Hervé COTTET pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je tiens à remercier également le Professeur Dominique HOURDET et Xavier ARCHER d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et d'avoir jugé ce travail.

Je remercie très sincèrement les Docteurs Régis DANIEL et Cédric PRZYBYLSKI du Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement de l'Université d'Evry pour avoir réalisé des analyses par spectrométrie de masse des échantillons de nitrocellulose. Merci également au Docteur Jérôme VIAL pour son aide lors des études chimiométriques. Je souhaite également remercier le Docteur Jean-Maurice MALLET du Laboratoire des Biomolécules de l'ENS pour ses précieux conseils lors de l'étude du mécanisme de dénitrification des nitrocelluloses. Merci au Professeur Jean-Marie AUBRY et à Adrien BENAZZOUZ du Laboratoire Chimie moléculaire et Formulation de l'école nationale supérieure de chimie de Lille pour leur collaboration lors de la recherche de nouveaux solvants permettant de solubiliser la nitrocellulose. Merci au Docteur Maxime BRIDOUX du Laboratoire d'expertise analytique du CEA à Bruyères le Châtel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser des analyses par spectrométrie de masse haute résolution.

Je remercie le Docteur José DUGAY pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant de réaliser du monitorat. Merci également à Matthieu FREMONT et Selma JEMMALI, stagiaires qui ont travaillé sur ce projet.

Je remercie également les doctorants et post-doctorants du laboratoire et notamment Miriam, Manel, Lilia, Nathaly, Fabien, Philippe et Ludivine pour leur soutien et leur sympathie.

REMERCIEMENTS

Enfin, merci à ma famille et à tous mes proches pour leur soutien, leurs encouragements et leurs conseils dans les moments difficiles.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
CHAPITRE I : Généralités sur les explosifs	23
1. Introduction	23
2. Classification des substances explosives.....	23
3. Fabrication des explosifs par nitration.....	27
CHAPITRE II : La nitrocellulose	29
1. Présentation de la nitrocellulose	29
1.1. Structure chimique de la nitrocellulose	29
1.2. Les différents types de nitrocellulose	29
1.2.1. Taux de nitration et propriétés physico-chimiques de la nitrocellulose	29
1.2.2. Applications de la nitrocellulose dans les formulations explosives.....	31
2. Procédés de nitration de la cellulose	34
2.1. Nitration de la cellulose avec de l'acide nitrique	34
2.2. Nitration à partir d'un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique	35
2.3. Nitration de la cellulose à partir d'un mélange d'acide nitrique et d'acide phosphorique.....	35
2.4. Nitration avec un mélange d'acide nitrique et d'acide acétique.....	36
2.5. Nitration de la cellulose avec un mélange d'acide nitrique et de solvants organiques	36
2.6. Stabilisation de la nitrocellulose	36
2.7. Récapitulatif des différents procédés de nitration de la cellulose	36
3. Procédé industriel de production de la nitrocellulose.....	38
4. Décomposition de la nitrocellulose	39
4.1. Dégradation biologique.....	39
4.2. Dégradation mécanique	41
4.3. Dégradation ultrasonore	41
4.4. Décomposition thermique	41
4.5. Décomposition photochimique.....	45
4.6. Décomposition alcaline	45
4.7. Décomposition en milieu acide	49
5. Techniques d'analyse de la nitrocellulose.....	49
5.1. Techniques d'analyse chromatographiques	50
5.1.1. Chromatographie en phase gazeuse	50
5.1.2. Chromatographie en phase liquide	53
5.1.2.1. Chromatographie d'exclusion stérique	53
5.1.2.2. Chromatographie de partage à polarité de phases inversée	56
5.1.2.3. Chromatographie ionique	58
5.2. Electrophorèse capillaire (CE)	60
5.3. Autres méthodes de détermination du taux de nitration	63
5.4. Techniques spectroscopiques	64
5.5. Techniques d'analyse thermique	66
5.6. Spectrométrie de mobilité ionique (IMS).....	68
5.7. Spectrométrie de masse	70

SOMMAIRE

5.8.	Extraction de la nitrocellulose	74
CHAPITRE III : Les carbohydrates		79
1.	Introduction	79
2.	Analyse des carbohydrates non dérivés par CE	80
2.1.	Détection des carbohydrates non dérivés	80
2.1.1.	Détection par UV direct	80
2.1.2.	Détection par UV ou fluorescence indirecte	81
2.2.	Séparation des carbohydrates non dérivés.....	81
3.	Analyse des carbohydrates après dérivation par CE.....	82
3.1.	Détection des carbohydrates après dérivation.....	82
3.1.1.	Les réactions de dérivation.....	82
3.1.2.	Les réactions d'amination réductrices.....	83
3.1.3.	Les différents agents de dérivation	84
3.1.4.	Dérivation des carbohydrates par le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate.....	87
3.2.	Séparation des carbohydrates dérivés.....	91
6.	Conclusion de l'étude bibliographique	95
 PARTIE II : APPROCHES FONDEES SUR L'HYDROLYSE ALCALINE DE LA NITROCELLULOSE : DETERMINATION DU TAUX DE NITRATION.....		97
Introduction		99
CHAPITRE I – Détermination du taux de nitration de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire après hydrolyse alcaline (article)		101
1.	Introduction	102
2.	Materials and methods	104
2.1.	Standards and electrolytes.....	104
2.2.	Instrumentation	104
2.3.	Electrophoretic procedures.....	105
2.4.	Alkaline hydrolysis of NC standards	105
2.5.	Single-base gunpowder extraction and alkaline hydrolysis	106
2.6.	Safety considerations	107
2.7.	Calculation of the denitration yield of alkaline hydrolysis of NC standards	107
2.8.	Calculation of the nitrogen content of NC contained in gunpowder	107
2.9.	Statistical approach of matrix effects	108
3.	Results and discussion	108
3.1.	CE method development.....	108
3.2.	Method validation	110
3.2.1.	Linearity	110
3.2.2.	Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ).....	111
3.2.3.	Matrix effects	111
3.2.4.	Selectivity	111
3.2.5.	Repeatability.....	112
3.3.	Application to real samples	113

SOMMAIRE

3.3.1.	Hydrolysis of NC standards	113
3.3.2.	Hydrolysis of NC contained in gunpowder	114
4.	Conclusions	115
CHAPITRE II – Optimisation multivariée de la réaction de dénitrification alcaline de la nitrocellulose : application à la détermination du taux de nitration		
1.	Introduction	120
2.	Materials and methods	122
2.1.	Standards and electrolytes	122
2.2.	Instrumentation	123
2.3.	Statistical analysis softwares	123
2.4.	Alkaline hydrolysis of NC standards	123
2.5.	NC hydrolysis in the presence of potentially interfering compounds	123
2.6.	Real sample preparation	123
2.7.	Electrophoresis conditions used to analyze NC hydrolysates	124
2.8.	Calculation of denitration yields and nitrogen contents	125
2.9.	Safety considerations	125
3.	Experimental design	125
3.1.	Selection of the factors and response	125
3.2.	Choice of the experimental design	125
3.3.	Factor ranges and levels	126
4.	Results and discussion	127
4.1.	ANOVA and fitting of quadratic model	127
4.2.	Effects of factors on denitration yields of weakly- and highly nitrated NCs ..	128
4.3.	Optimization	131
4.4.	Experimental validation and robustness study	136
4.5.	Study of potentially interfering additives	138
4.6.	Application to the determination of the nitrogen content of NC contained in smokeless gunpowders	139
4.7.	Correlation between nitrite to nitrate ion ratio and nitrogen content	140
5.	Conclusions	141
CHAPITRE III – Nouvelle méthode pour la détermination du taux de nitration de la nitrocellulose basée sur l'étude du ratio molaire des concentrations en ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse alcaline (article)		
1.	Introduction	146
2.	Experimental section	147
2.1.	Standards, real samples, and electrolytes	147
2.2.	Instrumentation	149
2.3.	Electrophoretic conditions	149
2.4.	Alkaline hydrolysis of NC standards	149
2.5.	Real samples	150
2.6.	Calculation of the denitration yield	151

SOMMAIRE

2.7.	Safety considerations	151
3.	Results and discussion	152
3.1.	Influence of the nitrogen content of NC on the molar ratio of nitrite to nitrate ion.....	152
3.2.	Highlight on the alkaline denitration reaction	156
3.3.	Applications to real samples	158
4.	Conclusions	160
	Conclusion	163

PARTIE III : APPROCHES FONDEES SUR L'HYDROLYSE ACIDE DE LA NITROCELLULOSE : DEPOLYMERISATION

Introduction

CHAPITRE I : Obtention d'une empreinte de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire après dépolymérisation en milieu acide et dérivation avec le 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate.....

1.	Introduction	171
2.	Materials and methods	172
2.1.	Standards and electrolytes.....	172
2.2.	Instrumentation	173
2.3.	Electrophoretic procedures.....	173
2.4.	Depolymerization of NC	174
2.5.	Derivatization of intact NC (without preliminary depolymerization step)	174
2.6.	Derivatization of NC after depolymerization step	174
2.7.	Derivatization of cellodextrin standards	174
2.8.	MS procedures	175
3.	Safety considerations	175
4.	Results and discussion	175
4.1.	Optimization of CE separation conditions	175
4.2.	Optimization of the derivatization conditions	178
4.3.	Application to fingerprinting of intact NCs	182
4.4.	NC fingerprinting after acid depolymerization	185
4.4.1.	Depolymerization conditions.....	185
4.4.2.	NC fingerprints.....	186
5.	Conclusions	189

CHAPITRE II : Développement d'une nouvelle méthode d'analyse de cellodextrines non dérivés par électrophorèse capillaire avec détection par absorbance UV directe induite photochimiquement

1.	Introduction	194
-----------	---------------------------	------------

SOMMAIRE

2.	Materials and methods	197
2.1.	Standards and electrolyte	197
2.2.	Instrumentation	198
2.3.	Statistical analysis softwares.....	198
2.4.	Electrophoretic conditions	198
2.5.	Calculation of the conductivity values	199
3.	Experimental design	199
3.1.	Selection of the factors and response.....	199
3.2.	Choice of the experimental design	199
3.3.	Factor ranges and levels.....	200
4.	Results and discussion	201
4.1.	ANOVA and fitting of quadratic model	202
4.2.	Effects of factors on carbohydrate migration and detection	202
4.3.	Optimization of the separation	206
4.4.	Experimental validation and robustness study.....	208
5.	Conclusions	211
	Conclusion	215

PARTIE IV : CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES MOLECULAIRES DE LA NITROCELLULOSE A PARTIR DE L'INSTRUMENTATION DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.....217

Introduction

CHAPITRE I : Recherche d'un solvant solubilisant la nitrocellulose

1.	Introduction	221
2.	Matériels et produits.....	222
2.1.	Etalons de nitrocellulose et solvants.....	222
2.2.	Matériel	222
2.3.	Préparation des solutions	222
3.	Résultats et discussion	222
4.	Conclusion.....	229

CHAPITRE II : Corrélation entre les masses moléculaires des nitrocelluloses et leurs viscosités intrinsèques mesurées avec l'instrumentation de l'électrophorèse capillaire.....231

1.	Introduction	232
2.	Materials and methods	233
2.1.	Standards.....	233
2.2.	Instrumentation	233
2.3.	Sample preparation.....	234

SOMMAIRE

2.4.	Experimental protocol for viscosity measurement.....	234
2.5.	Viscosity calculations.....	234
3.	Safety considerations	235
4.	Results and discussion	235
4.1.	Choice of the NC solvent and capillary dimensions	235
4.2.	Determination of NC intrinsic viscosity	236
4.3.	Calculation of Mark-Houwink parameters	238
4.4.	Estimation of radius of gyration	240
5.	Conclusion.....	241
	Conclusion	245
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	247
	Annexes	255
	ANNEXE A : L'électrophorèse capillaire de zone	257
A.1	Principe et grandeurs fondamentales	257
A.1.2	Electromigration.....	257
A.1.2	Electroosmose	258
A.2	L'électrophorèse capillaire de zone	259
A.2.1	Principe de séparation	259
A.2.2	Paramètres d'optimisation d'une séparation	261
A.2.3	La détection en électrophorèse capillaire.....	261
A.2.4	Mise en œuvre expérimentale	261
	ANNEXE B : Consignes de sécurité liées à la manipulation de nitrocellulose	263

➤ Publications :

1. Talanta 125 (2014) 174-180

Determination of the nitrogen content of nitrocellulose by capillary electrophoresis after alkaline denitration. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, P. Gareil

2. Forensic Science International, soumise

Multivariate optimization of the denitration reaction for safer determination of nitrocellulose nitrogen content. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, J. Vial, P. Gareil.

3. Journal of Hazardous Materials, soumise

A new method for the determination of the nitrogen content of nitrocellulose based on the study of the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, J-M. Mallet, P. Gareil.

➤ Publications à soumettre:

4. Capillary electrophoresis fingerprinting of 8-amino pyrene-1,3,6 -trisulfonate derivatized nitrocellulose after acid depolymerization. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, P. Gareil.

5. Determination of underivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with direct UV-detection. **E. Alinat**, S. Jemmali, N. Delaunay, X. Archer, P. Gareil.

6. Correlating molecular masses of nitrocelluloses with their intrinsic viscosities measured using capillary electrophoresis instrumentation. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, P. Gareil.

➤ Communications orales :

1. 19^{ème} journée d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter, Paris, 24 octobre 2013

Détermination par électrophorèse capillaire du taux de nitration de nitrocellulose après dénitration alcaline. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, J. Vial, P. Gareil.

2. VII^{ème} Journées scientifiques du Club Jeunes de l'Association Francophone des Sciences Séparatives (AFSEP), Pau, 19-20 juin 2014.

Nouvelles stratégies pour la caractérisation de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, P. Gareil.

➤ Communications par affiches :

1. **HPLC 2013: 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, June 16-20, 2013.**

Determination of the nitrogen content of nitrocellulose by capillary electrophoresis after alkaline denitration. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, P. Gareil.

2. **ITP2013: 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, Tenerife, October 6-9, 2013.**

CE monitoring of the experimental design investigation of nitrocellulose denitration under alkaline conditions. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, J. Vial, P. Gareil.

3. **ISADE 2013: 11th International Symposium on the Analysis and Detection of Explosives 2013, The Hague, October 7-10, 2013.**

Towards a new protocol for the determination of nitrogen content of highly-nitrated nitrocelluloses by capillary electrophoresis after alkaline denitration. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, J. Vial, P. Gareil.

4. **HPLC 2014: 41th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, New Orleans, May 11-15, 2014.**

A new method for the determination of the nitrogen content of nitrocellulose based on the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, J-M. Mallet, P. Gareil.

5. **HPLC 2014: 41th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, New Orleans, May 11-15, 2014.**

Capillary electrophoresis fingerprinting of 8-amino pyrene-1,3,6 -trisulfonate derivatized nitrocellulose after acid depolymerization. **E. Alinat**, N. Delaunay, X. Archer, P. Gareil.

6. **HPLC 2014: 41th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, New Orleans, May 11-15, 2014.**

Determination of underivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with direct UV-detection. **E. Alinat**, S. Jemmali, N. Delaunay, P. Gareil.

7. **SEP2013 : 10^{ème} congrès francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages, Paris, 4-7 juin 2013.**

Détermination par électrophorèse capillaire du taux de nitration de nitrocelluloses après dénitration alcaline. **E. Alinat**, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer, P. Gareil.

LISTE DES ABREVIATIONS

2-AA : 2-aminoacridone	LMW : low molecular weight
AHNS : acide 4-amino-5-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique	LOD : limit of detection
3-ANDA : acide 3-aminonaphtalène-2,7-disulfonique	LOQ : limit of quantitation
ANDSA : acide 7-aminonaphtalène-1,3-disulfonique	NT : nitrotoluène
ANOVA : analysis of variance	M_n : masse molaire moyenne en nombre
2-ANSA : acide 2-aminonaphtalène-1-sulfonique	M_w : masse molaire moyenne en masse
5-ANSA : acide 5-aminonaphtalène-1-sulfonique	MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
ANTS : acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique	MDSC : modulated differential scanning calorimetry
2-AP : 2-aminopyridine	MS : mass spectrometry
APTS : 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate	NC : nitrocellulose
6-AQ : 6-aminoquinoline	NG : nitroglycérine
BGE : background electrolyte	NQ : nitroguanidine
CBQCA : 3-(-4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldéhyde	NS : naphthalene sulfonate
CCD : central composite design	p-AB : <i>p</i> -aminobenzonitrile
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	PBX : Polymer-bonded explosive
CE : capillary electrophoresis	PCA : principal component analysis
CL20 : hexanitrohexaazaisowurtzitane	PD : plasma desorption
DAD : diode array detector	PDMS : polydiméthylsiloxane
DBP : dibutylphthalate	PETN : tétranitrate de pentaérythritol
DMA : dynamic mechanical analysis	PMP : 1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone
DMNB : 2,3-diméthyl-2,3-dinitrobutane	PMPMP : 1-(<i>p</i> -méthoxy)phényl-3-méthyl-5-pyrazolone
DMSO : diméthylsulfoxyde	Py : pyrolyse
DNT : dinitrotoluène	RDX : cyclotriméthylènetrinitramine
DPA : diphenylamine	RED : relative energy difference
DS : degré de substitution	SEC : size exclusion chromatography
DSC : differential scanning calorimetry	SIMCA : Soft independent modelling by class analogy
DTA : differential thermal analysis	SPME : solid-phase microextraction
EC : éthylcentralite	STANAG : Standardisation Agreement
ELSD : evaporative light scattering detector	TATB : 1,3,5-triamino-2,4,6-trinitrobenzene
EOF : electroosmotic flow	TGA : thermogravimetric analysis
FTIR : Fourier transform infrared	THF : tétrahydrofurane
GC : gas chromatography	TNT : trinitrotoluène
HDMB : hexadimethrine bromide	TOF : time of flight
HMW : high molecular weight	TRSE : 5-carboxytétraméthylrhodamine succinimidyl ester
HMX : cyclotétraméthylène-tétranitramine	UV : ultraviolet
HPLC : high performance liquid chromatography	
IC : ion chromatography	
IMS : ion mobility spectrometry	
IRMS : isotopic ratio mass spectrometry	
LIF : laser-induced fluorescence detection	

Au cours de ces dernières années, de nombreux attentats mortels perpétrés par des groupes terroristes et impliquant l'utilisation de nouveaux matériaux explosifs ont eu lieu. L'identification univoque de ces nouveaux explosifs après attentat par les services de la police scientifique et technique est nécessaire pour apporter des indices quant à l'origine de la charge et des auteurs de l'attentat. Pour cela, le développement de nouvelles techniques d'analyse performantes permettant l'identification de la charge explosive utilisée est indispensable. En effet, ces techniques doivent permettre de déterminer la nature des explosifs retrouvés à l'état de traces dans des matrices complexes, et à partir de là, la provenance ou la filière d'obtention.

Les explosifs utilisés peuvent être des substances organiques ou inorganiques. En ce qui concerne les explosifs organiques, le 2,4,6-trinitrotoluène et le tétranitrate de pentaérythritol sont les composés les plus couramment rencontrés après attentat. Les nitroaromatiques (2,4,6-trinitrotoluène, 2,4-dinitrotoluène, 2,6-dinitrotoluène et le 1,3,5-trinitrobenzène), les nitramines (hexogène et octogène), les peroxydes et les esters nitriques (nitroglycérine, pentrite et nitrocellulose) sont également fréquemment utilisés dans les charges explosives. L'analyse des explosifs organiques nitrés a été largement étudiée, notamment dans des matrices environnementales (eaux et sols). Différentes techniques séparatives ont été mises en œuvre telles que la chromatographie en phase liquide, la chromatographie en phase gazeuse et l'électrophorèse capillaire pour l'analyse de ces substances.

Cependant, il n'existe encore actuellement que très peu de techniques de caractérisation des nitrocelluloses (NC) dans des formulations explosives. En effet, les NC présentant des taux de nitration supérieurs à 12,5 % sont utilisées dans la fabrication de produits explosifs (dynamites et poudres propulsives) alors que les NC ayant des taux de nitration inférieurs à 12,5 % entrent dans la composition de produits courants (vernis, encres et vernis à ongles). Il est donc possible de retrouver ces 2 catégories de NC dans des résidus post-attentat. C'est pourquoi il est nécessaire en premier lieu de développer des méthodes d'analyse permettant de discriminer les NC selon leurs taux de nitration afin de conclure sur la présence ou l'absence de NC explosives dans les résidus collectés après attentat. Actuellement, la seule technique utilisée par le Laboratoire Central de la Préfecture de Police pour mettre en évidence la présence de NC est la chromatographie sur couche mince (CCM). Cependant, l'interprétation des résultats obtenus est difficile à cause de son manque de solubilité dans les solvants usuels. De plus, cette technique ne permet ni de déterminer ni même d'évaluer le taux de nitration des NC. En effet, la caractérisation des nitrocelluloses reste un challenge analytique à cause de sa complexité chimique et structurale, sa masse molaire très élevée et son comportement inhabituel en solution. Cette problématique a fait l'objet de cette thèse en évaluant le potentiel de la technique d'électrophorèse capillaire.

Après une analyse incontournable de la bibliographie, peu abondante sur le cœur du sujet, nous avons dans un premier temps, compte tenu de ce qui précède, dirigé nos efforts vers la discrimination des NC explosives et non-explosives et la détermination de leurs taux de nitration. Nous avons décidé de revisiter les conditions de dénitrification alcaline de la NC afin de les optimiser, et compte tenu de possibles interactions entre paramètres, une approche multivariée a été mise en place, ce qui n'avait jamais été fait. En complément de l'optimisation de ces conditions, nous avons découvert une propriété particulière du mécanisme de dénitrification qui a abouti à la proposition d'une nouvelle méthode de détermination du taux de nitration, utilisant l'électrophorèse capillaire pour la quantification des ions nitrite et nitrate libérés lors de l'hydrolyse alcaline.

Ensuite, et par analogie avec les approches utilisées dans le cas des protéines, nous avons cherché à développer de nouvelles approches pour la NC permettant d'obtenir une empreinte caractéristique, après dépolymérisation partielle en milieu acide. L'idée était d'obtenir des mélanges d'oligosaccharides qui soient représentatifs de l'échantillon contenant la nitrocellulose de départ et qui retiennent par conséquent de l'information analytique sur celui-ci (nitrocellulose, cellulose ayant servi à la fabriquer, impuretés). D'une part, les conditions de dépolymérisation ont dû être optimisées, afin de générer des mélanges informatifs. D'autre part, nous avons dû développer des méthodes analytiques permettant d'analyser les produits obtenus après dépolymérisation. En s'inspirant des méthodes proposées pour la caractérisation des parties glycosylées des glycoprotéines (glycanes), une première méthode a été redéveloppée, impliquant une dérivation préalable de l'échantillon par un réactif fluorescent chargé, suivie d'une séparation par électrophorèse capillaire couplée avec une détection par fluorescence induite par laser. Alternativement, nous avons envisagé de réduire le temps total d'analyse en mettant au point également une méthode originale permettant l'analyse de ces produits de dépolymérisation de la NC par électrophorèse capillaire sans dérivation préalable. Un mode de détection possible est alors l'absorbance UV directe, induite après réaction photochimique des analytes dans la fenêtre de détection.

En outre, l'instrumentation de l'électrophorèse capillaire a été utilisée pour la caractérisation en taille d'échantillons de NC à travers la mesure de viscosités intrinsèques. La détermination des paramètres de Mark-Houwink qui en résulte donne accès aux rayons de gyration. L'idée serait ici de pouvoir constituer une base de données permettant de déterminer la masse molaire moyenne d'échantillons de NC inconnues, apportant ainsi un complément de caractérisation sans doute nécessaire dans un contexte d'enquête judiciaire.

Enfin, une réflexion prospective a été menée tout au long de la préparation de cette thèse, concernant la solubilisation des NC, qui dépend étroitement de leur taux de nitration et de leur masse

INTRODUCTION GENERALE

molaire. La recherche de nouveaux solvants ou mélanges de solvants, et plus particulièrement de ceux qui seraient les plus transparents dans l'UV que possible, nous est apparue importante. Ce travail a été essentiellement accompli à L'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, avec laquelle nous avons démarré une collaboration. De nouvelles approches séparatives pour la NC intègre par électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux pourraient ainsi voir le jour.

Compte tenu de la dangerosité potentielle des nitrocelluloses (inflammabilité, explosivité), la considération des conditions permettant de gérer les risques liés à la manipulation de tels échantillons est restée une composante constante, tout au long de notre travail expérimental.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités sur les explosifs

1. Introduction

Une explosion se produit lorsqu'une grande quantité d'énergie est libérée dans un court intervalle de temps. Les explosions peuvent être divisées en 3 catégories : (i) les explosions physiques, (ii) les explosions chimiques et (iii) les explosions atomiques [1,2]. Dans la suite de cette étude, uniquement les explosions chimiques causées par des réactions chimiques entre compositions explosives seront évoquées. Une explosion chimique résulte d'une réaction chimique qui a lieu dans un intervalle de temps très court et libérant une grande quantité de chaleur et de gaz. Les grandes quantités de gaz libérées lors de ces réactions exothermiques conduisent à une augmentation de la pression engendrant alors une onde de choc destructrice pour l'atmosphère environnante.

Une substance est dite explosive lorsqu'elle est susceptible de libérer dans un faible intervalle de temps l'énergie qu'elle contient suite à une réaction chimique quasi-instantanée [1]. La décomposition des substances explosives peut avoir lieu de 3 manières différentes : (i) la combustion, (ii) la détonation et (iii) la déflagration [3].

La déflagration correspond à une combustion rapide se propageant à une vitesse (quelques mètres par seconde à quelques centaines de mètres par seconde) inférieure à la vitesse du son dans le matériau énergétique. La déflagration d'une substance explosive peut avoir lieu suite à un choc, une étincelle ou une montée en température [3].

La détonation correspond à une combustion plus rapide que la déflagration et se propageant à une vitesse supérieure à celle du son. A cause de la rapidité de ces réactions, des ondes de choc à hautes pressions sont formées et causent de nombreux dommages jusqu'à des distances importantes autour de la charge. La déflagration peut être obtenue suite à un changement de régime de combustion ou suite à un choc dont la vitesse est suffisamment importante pour former une onde de choc [3].

2. Classification des substances explosives

La majorité des substances qui sont classées parmi les explosifs chimiques contiennent de l'oxygène, de l'azote ou des éléments oxydables tels que le carbone ou l'hydrogène. Au cours du siècle dernier, de nombreuses classifications des explosifs ont été proposées. Cependant, la classification qui a été retenue est basée sur un regroupement selon leurs performances et leurs utilisations [1,4]. En considérant cette classification les explosifs peuvent être divisés en 4 catégories (Figure I-I-1).

- les explosifs primaires,
- les explosifs secondaires,
- les poudres propulsives,
- les compositions pyrotechniques.

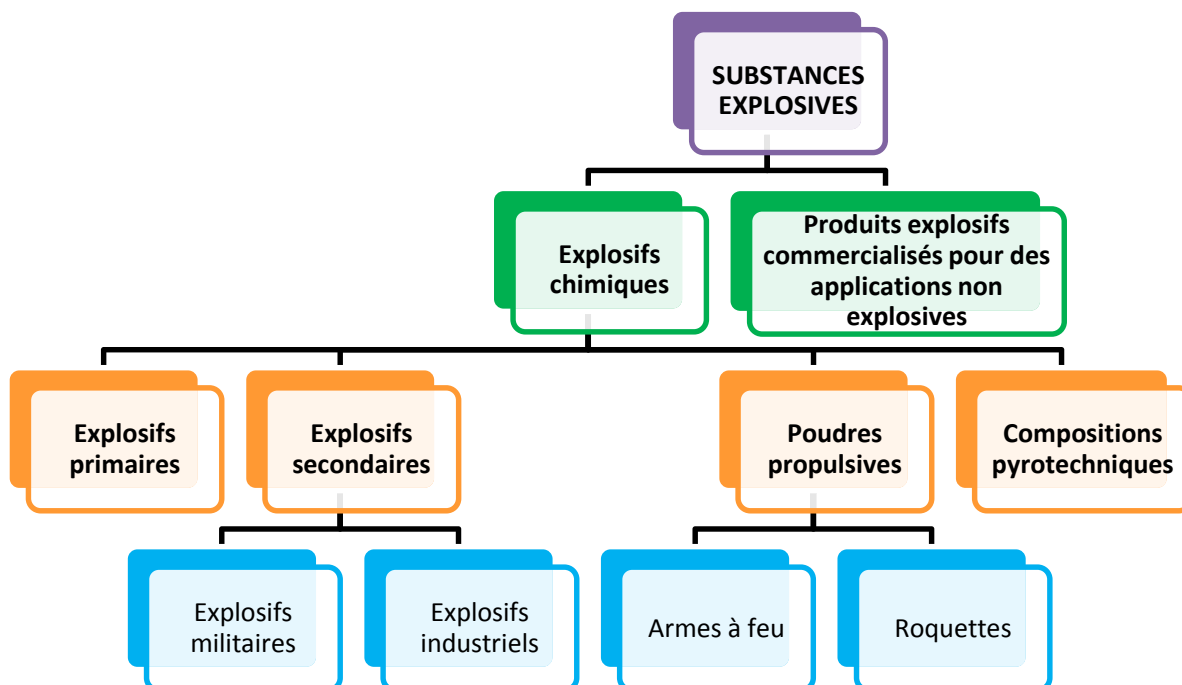


Figure I-I-1 : Classification des substances explosives.

Les poudres propulsives contiennent des matières combustibles contenant tout l'oxygène nécessaire à leur combustion. Les poudres propulsives brûlent mais n'explosent pas. La combustion s'accompagne généralement de flammes ou d'étincelles et de l'émission d'un son. Les poudres propulsives peuvent être initiées par une flamme ou une étincelle et passent relativement lentement (quelques millisecondes) de l'état solide à l'état gazeux. La poudre noire (mélange de salpêtre, soufre et de charbon), les poudres propulsives sans fumée et les explosifs utilisés pour l'exploitation minière sont des poudres propulsives.

La combustion des compositions pyrotechniques conduit à la production de fumée colorée, de bruit, et à l'émission de lumière de couleur vive. Les compositions pyrotechniques se décomposent à des vitesses plus faibles que celles des explosifs et des poudres et libèrent des résidus solides. Elles contiennent un réducteur et un oxydant (mélange de composés inorganiques) spécialement formulés pour libérer une grande quantité d'énergie. Cette énergie est ensuite utilisée pour produire de la lumière et/ou de la fumée.

Les explosifs primaires, à la différence des explosifs secondaires, subissent une transition très rapide de la combustion à la détonation. Ils peuvent ainsi entraîner la détonation d'explosifs moins

sensibles et sont très souvent utilisés en tant que dispositif d'amorçage (détonateurs). Au cours de la détonation, une grande quantité de chaleur et/ou une onde de choc sont produites. Les explosifs primaires peuvent détoner sous l'effet d'un choc ou bien d'un apport de chaleur. Ils sont très sensibles à la friction et aux décharges électriques. L'explosion de ces substances peut avoir lieu dans un espace confiné ou non confiné. L'azoture de plomb, le styphnate de plomb (2,4,6-trinitrorésorcinate de plomb), le mononitrorésorcinate de plomb, le dinitrobenzofuroxanne de potassium et le styphnate de barium sont les explosifs primaires les plus couramment utilisés [1,5,6].

Contrairement aux explosifs primaires, les explosifs secondaires ne peuvent pas détoner sans l'apport d'une énergie d'activation suffisamment élevée. Ils sont moins sensibles aux faibles apports de chaleur et aux faibles chocs. Ils sont plus puissants que les explosifs primaires et peuvent détonner grâce au choc produit lors de l'explosion d'un explosif primaire. Ces explosifs peuvent être utilisés à usage militaire ou industriel [1]. Parmi les explosifs secondaires, il existe trois familles d'explosifs nitrés qui sont : (i) les nitroaromatiques, (ii) les nitramines et (iii) les esters nitriques (Figure I-I-2) [7].

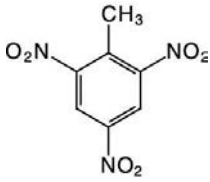
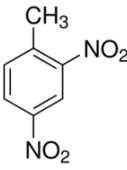
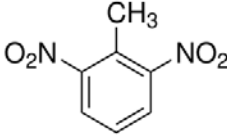
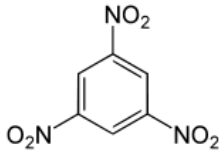
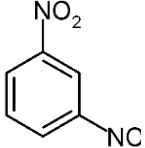
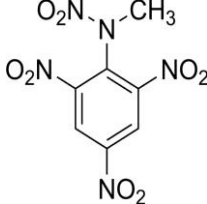
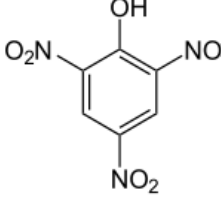
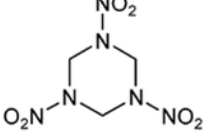
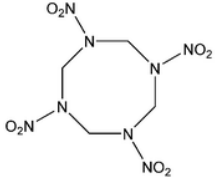
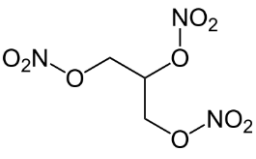
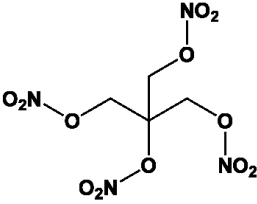
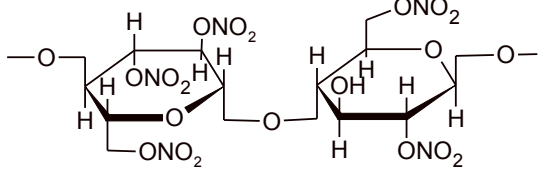
NITROAROMATIQUES			
			
2,4,6-trinitrotoluène (2,4,6-TNT)	2,4-dinitrotoluène (2,4-DNT)	2,6-dinitrotoluène (2,6-DNT)	1,3,5-trinitrobenzène
			
1,3-dinitrobenzène	Tétryl	2,4,6-trinitrophénol	
NITRAMINES			
			
Hexogène (RDX)	Octogène (HMX)		
ESTERS NITRES			
			
Nitroglycérine (NG)	Pentrite (PETN)	Nitrocellulose (NC)	

Figure I-I-2 : Structure des principaux explosifs nitrés

La nitrocellulose (NC), le TNT (1-méthyl-2,4,6-trinitrobenzène), le tétryl (N-méthyl-N,2,4,6-tétranitroaniline), l'acide picrique (2,4,6-trinitrophénol), la nitroglycérine, la nitroguanidine, le RDX (1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane), le HMX (cyclotétraméthylène-tétranitramine) et le TATB (1,3,5-triamino-2,4,6-trinitrobenzène) sont les explosifs secondaires les plus fréquemment rencontrés.

3. Fabrication des explosifs par nitration

La plupart des explosifs militaires ou industriels (NC, TNT, RDX, nitroglycérine,...) est obtenue suite à une réaction de nitration. La nitration est une réaction chimique au cours de laquelle des groupements nitro (NO_2) provenant de l'agent de nitration sont introduits par substitution dans des composés organiques. Les réactions de nitration peuvent être divisées en 3 catégories (Figure I-I-3) [8].

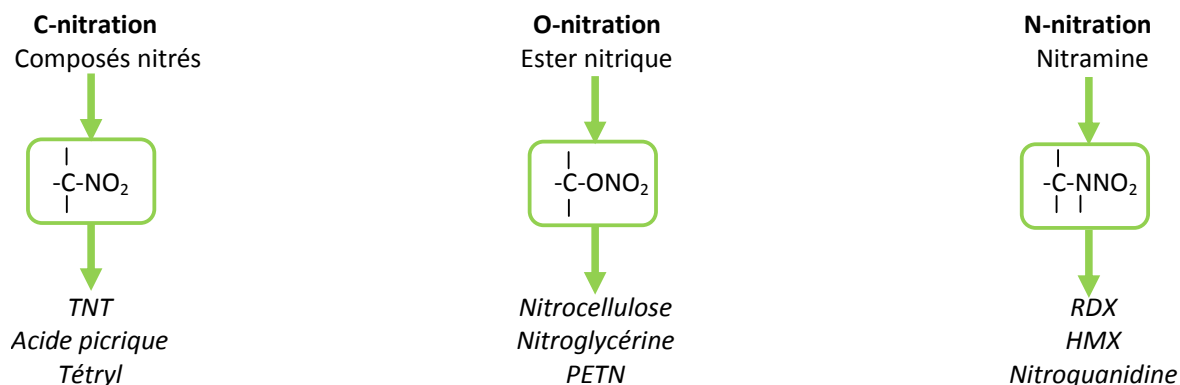


Figure I-I-3 : Classification des réactions de nitration des explosifs. D'après [8].

Ces catégories de réaction de nitration permettent d'obtenir les principaux explosifs organiques les plus utilisés au cours d'attentats. La suite de cette étude s'est focalisée sur la mise au point de méthodes analytiques permettant de caractériser la nitrocellulose dont seules des traces n'ayant pas subi d'explosion sont retrouvées dans les résidus après attentat.

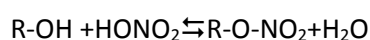
Références

- [1] J. Akhavan, The Chemistry of explosives, Classification of explosive materials, RSC, Paperbacks, Cambridge, 1998, p 18-42.
- [2] J. Calzia, Les substances explosives et leurs nuisances, Notions sur le caractère explosif, Dunod, Paris, 1969, p 3-46.
- [3] J. Akhavan, The Chemistry of explosives, Ignition, initiation and thermal decomposition, RSC, Paperbacks, Cambridge, 1998, p 58-68.
- [4] J.A. Zukas, Explosive effects and applications, Explosive developments and fundamentals of explosives technology, Springer, New York, 1998, p 23-45.
- [5] J. Calzia, Les substances explosives et leurs nuisances, Les explosifs primaires, Dunod, Paris, 1969, p 64-79.
- [6] J. Quinchon, Les poudres, propergols et explosifs, Tome 1 : Les explosifs, les explosifs primaires, Tec & Doc, Paris, 1982, p 17-39.
- [7] S. Lordel, Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain, Thèse de doctorat, UPMC, 2011.
- [8] J. Akhavan, The Chemistry of explosives, Manufacture of explosives, RSC, Paperbacks, Cambridge, 1998, p 112-141.

CHAPITRE II : La nitrocellulose

1. Présentation de la nitrocellulose

La nitrocellulose (ou nitrate de cellulose) se présente sous la forme d'une matière blanche, de texture fibreuse et d'apparence semblable au coton. Elle est synthétisée à partir de fibres de cellulose. La cellulose est un polysaccharide constitué d'une centaine à plusieurs milliers d'unités D-glucopyranose. Cette molécule est un polymère naturel qui réagit avec l'acide nitrique pour former la nitrocellulose suite à la réaction d'estérification réversible et hautement exothermique suivante [1] :



1.1. Structure chimique de la nitrocellulose

La nitrocellulose présente une structure chimique semblable à la cellulose. Les deux macromolécules sont constituées d'unités D-glucopyranose liées par des liaisons glucosidiques de conformation β (1 \rightarrow 4) conduisant à l'obtention d'une structure linéaire. La différence majeure entre les deux structures a lieu sur les carbones C2, C3 et C6. Dans le cas de la nitrocellulose, les groupements hydroxyle fixés sur ces carbones sont remplacés par des groupements nitro [1,2]. La structure chimique de la nitrocellulose est présentée en Figure I-II-1 et se représente chimiquement par la formule $[C_6H_7O_2(OH)_{3-x}(ONO_2)_x]_n$, où x indique le nombre de groupements hydroxyle substitués par un groupement nitro. La majorité des nitrocelluloses commerciales présente une masse moléculaire moyenne comprise entre 20 000 et 250 000 Da [3].

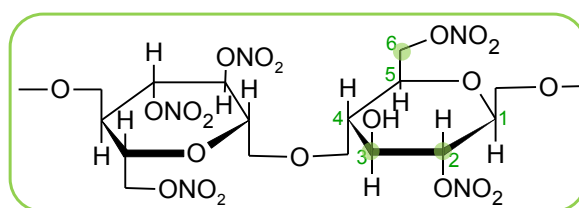


Figure I-II-1 : Structure chimique de la nitrocellulose.

1.2. Les différents types de nitrocellulose

1.2.1. Taux de nitrage et propriétés physico-chimiques de la nitrocellulose

Il est possible d'obtenir des nitrocelluloses ayant des taux de nitrage différents grâce à la différence de réactivité des carbones C2, C3 et C6. En effet, la substitution sera plus favorable sur le carbone C6 (fonction alcool primaire) qui est le plus réactif. Les carbones C2 et C3 présentent une

réactivité similaire [1,2]. Le nombre de groupements hydroxyle substitués par des groupements nitro dans un monomère de la molécule est défini par le degré de substitution (DS) qui est calculé à partir du taux de nitration, exprimé comme le pourcentage massique d'azote, selon l'équation (1) :

$$DS = \frac{3,6 \times \text{taux de nitration (\%)}}{31,13 - \text{taux de nitration (\%)}} \quad (1)$$

Le degré de substitution varie entre 1 et 3 et correspond aux taux de nitration, exprimés en pourcentages donnés dans le Tableau I-II-1 [3-5].

Type de nitrocellulose	Degré de substitution (DS)	Taux de nitration (%)
Nitrocellulose mononitrée	1	6,79
Nitrocellulose dinitrée	2	11,11
Nitrocellulose trinitrée	3	14,14

Tableau I-II-1 : Relation entre le degré de substitution et le taux de nitration de différents types de nitrocellulose.

Le degré de substitution de la molécule ne donne pas d'information sur la distribution des esters nitriques dans la chaîne polymère. Par exemple une nitrocellulose contenant 50 % d'unités trinitrées, 34 % d'unités dinitrées, 16 % d'unités mononitrées et aucune unité sans ester nitrique a un DS de 2,3 [3].

Le taux de nitration théorique maximum est de 14,14 % ce qui correspond à une substitution de tous les groupements hydroxyle de la molécule par des groupements nitro. En pratique, le taux de nitration maximum atteint est de 13,5 %. En effet, la synthèse de nitrocellulose ayant un taux de nitration plus élevé est un procédé onéreux et conduit à la formation de produits hautement instables [1]. Le taux de nitration est une propriété très importante de la nitrocellulose car il affecte directement les autres propriétés de ce polymère comme la solubilité et la viscosité. La solubilité de la nitrocellulose diminue lorsque le degré de substitution et le degré de polymérisation (qui se définit par le nombre de monomères par chaîne polymère) augmentent. Ainsi, la nitrocellulose faiblement nitrée (DS= 1,9-2,1) est soluble dans les alcools, les esters, les cétones et les esters de glycol tandis que la nitrocellulose hautement nitrée (DS = 2,1-2,4) est insoluble dans les alcools mais peut être solubilisée dans les esters, les cétones et les éthers de glycol. En présence d'un solvant, la structure polymère gonfle et conduit à la formation d'une solution colloïdale [2]. Les principales propriétés physico-chimiques de la nitrocellulose sont rassemblées dans le Tableau I-II-2 [3].

Propriétés générales	
Apparence	Fibreuse -blanche-jaunâtre
Indice de réfraction	1,51
Limite inférieure de transmission de la lumière (nm)	313
Perméabilité à la vapeur d'eau à 21°C (g/cm ² /cm/h) ×10 ⁶	2,8
Effet de la lumière sur la décoloration	modéré
Effet du vieillissement	léger
Caractéristiques de solubilité et compatibilité chimique	
Principaux solvants de dissolution	Esters, cétones, mélange ester-cétone
Résines compatibles	Quasiment toutes
Plastifiants compatibles	Quasiment tous y compris les huiles végétales
Cires et goudrons compatibles	Aucun
Dérivés de cellulose compatibles	Ethylcellulose, acétate de cellulose, éthylhydroxyéthylcellulose
Résistance à diverses substances	
Eau froide	Excellente
Eau chaude	Excellente
Acides faibles	Moyenne
Acides forts	Faible
Bases fortes	Faible
Alcools	Partiellement soluble
Cétones	Soluble
Esters	Soluble
Hydrocarbures aromatiques	Bonne
Hydrocarbures aliphatiques	Excellente
Huiles minérales	Excellente
Huiles animales	Bonne
Huiles végétales	Moyenne à bonne

Tableau I-II-2 : Principales propriétés physico-chimiques de la nitrocellulose d'après [3].

La nitrocellulose est extrêmement inflammable et son point critique est de 12,8 °C (coupelle fermée). Son point de fusion et sa température d'auto-ignition sont compris entre 160 et 170 °C. A cause de la température basse de son point critique et de son potentiel d'explosion important la nitrocellulose est classée parmi les substances explosives et hautement inflammables [5].

1.2.2. Applications de la nitrocellulose dans les formulations explosives

Le taux de nitration permet de définir les applications du produit. Les nitrocelluloses présentant un faible taux de nitration (< 12,5 %) sont utilisées pour la fabrication de films photographiques, d'encre, de peintures et de vernis. Les nitrocelluloses ayant un taux de nitration élevé (> 12,5 %) sont utilisées dans des formulations explosives (poudres propulsives pour arme à feu et dynamites) [1]. Il est donc possible de retrouver ces deux types de NC dans des résidus post-attentat. Grâce aux

propriétés mécaniques de la nitrocellulose, des poudres explosives de différentes géométries (grains) peuvent être fabriquées (Figure I-II-2).

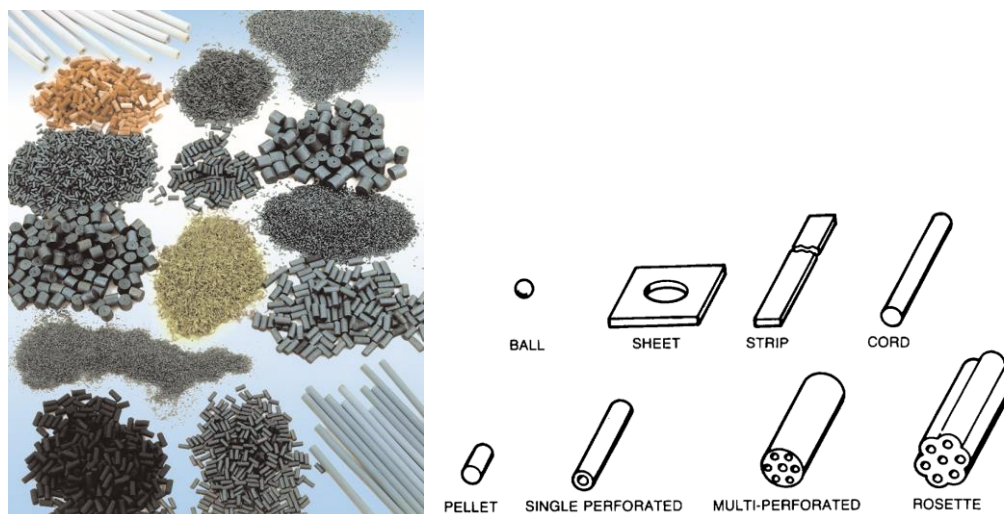


Figure I-II-2 : Exemples de géométrie de poudres propulsives formulées à base de nitrocellulose.

La taille des grains dépend de l'arme à feu qui est utilisée. Les grains utilisés dans les canons sont ceux dont la taille est la plus importante et qui mettent plus de temps pour brûler. La forme des grains a aussi une importance car elle influence la surface spécifique et donc la vitesse de combustion (plus la surface spécifique est élevée plus la vitesse de combustion est rapide). Indépendamment de la taille et la forme des grains, la composition des poudres a également une influence sur leurs performances [6].

En fonction de leur composition, les poudres explosives peuvent être classées en trois catégories [7,8] :

- la poudre de type simple base, constituée principalement de nitrocellulose ($\approx 90\%$) ayant un taux de nitration compris entre 12,5 et 13,2 % est utilisée dans tous les types d'armes à feu allant du pistolet aux armes d'artillerie.

- la poudre de type double base, constituée de nitrocellulose et d'une autre substance explosive telle que la nitroglycérine est utilisée dans les mortiers et les pistolets. L'ajout de nitroglycérine va permettre d'augmenter la quantité d'énergie libérée et la pression de gaz. Cependant, la température d'explosion devient beaucoup plus importante pouvant entraîner une usure prématurée de l'arme à feu.

- la poudre de type triple base, contenant de la nitrocellulose, de la nitroglycérine et de la nitroguanidine est utilisée pour les armes de gros calibre et les canons des chars. L'ajout de 50 % de nitroguanidine permet de diminuer la température de la flamme et d'augmenter le volume de gaz

libéré. Par conséquent, la lueur de l'éclair produite lors du tir est moins importante et le canon de l'arme à feu est moins endommagé.

Cependant, les poudres explosives ne sont pas constituées uniquement de matériaux énergétiques comme la nitrocellulose. Elles contiennent également des additifs qui présentent différentes fonctions résumées dans le Tableau I-II-3.

Fonction	Additif	Action
Agent stabilisant	Ethylcentralite (1,3-diéthyl-1,3-diphénylurée), méthylcentralite (1,3-diméthyl-1,3-diphénylurée), craie et diphénylamine	Augmente la durée de vie de la poudre propulsive
Plastifiant	Dibutylphtalate, éthylcentralite et méthylcentralite	Gélification de la nitrocellulose
Agent refroidissant	Dibutylphtalate, éthylcentralite, méthylcentralite et dinitrotoluène	Réduit la température de flamme
Modérateur superficiel	Dibutylphtalate, éthylcentralite, méthylcentralite et dinitrotoluène	Réduit la vitesse de combustion de la surface du grain
Lubrifiant de surface	Graphite	Améliore les performances d'écoulement
Inhibiteur de flamme	Sulfate de potassium, nitrate de potassium, fluorure d'aluminium et cryolite	Réduit la lueur de bouche
Agent décuivrant	Feuille d'étain ou de plomb, composés contenant de l'étain ou du plomb	Réduit le dépôt de cuivre laissé par la ceinture de projectile
Agent anti-usure	Dioxyde de titane et talc	Réduit l'usure de l'âme du canon

Tableau I-II-3: Principaux additifs utilisés dans les poudres explosives à base de nitrocellulose d'après [6].

Comme décrit précédemment, la nitrocellulose est également utilisée dans la dynamite qui est un terme générique utilisé pour désigner différentes variétés de compositions explosives. Il existe deux catégories de dynamites qui sont les dynamites gélamines et les dynamites non-gélamines. Les compositions de ces 2 types de dynamites sont rassemblées dans le Tableau I-II-4.

Nom	Combustible	Oxydant
Dynamite gélatine		
Dynamite gélatine	25-55 % de nitroglycérine, 1-5 % de NC et sciure de bois	Nitrates inorganiques
Dynamite semi-gélatine	15-20 % de nitroglycérine, 1-5 % de NC et sciure de bois	Nitrates inorganiques
Gélinite	25-55 % de nitroglycérine, 1-5 % de NC et sciure de bois	Nitrate de sodium ou de potassium
Gélinite ammoniacale	25-55 % de nitroglycérine, 1-5 % de NC et sciure de bois	Nitrate d'ammonium
Dynamite non gélatine		
Dynamite non-gélatine	10-50 % de nitroglycérine et sciure de bois	Nitrate de sodium ou de potassium
Dynamite ammoniacale	10-50 % de nitroglycérine et sciure de bois	Nitrate d'ammonium

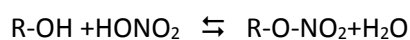
Tableau I-II-4 : Différents types et compositions des dynamites. NC : nitrocellulose.

2. Procédés de nitration de la cellulose

La nitrocellulose est le premier dérivé de cellulose qui a été synthétisé au laboratoire. Le précurseur de la nitrocellulose (appelé xiloïdine) a été préparé par Braconnot en 1832 par traitement de la cellulose (issue de sciure ou papier) avec de l'acide nitrique concentré. Par cette méthode de traitement, il s'en suit la formation d'un produit instable. A ce jour, plusieurs méthodes de synthèse de la nitrocellulose ont été mises en œuvre dans le but d'obtenir un produit le plus stable possible, homogène et ayant un taux de nitration bien défini. La nitrocellulose a été découverte réellement en 1846 lorsque Schönbein a utilisé comme bain de nitration de la cellulose un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique. Ce procédé conduisant à la formation de nitrocellulose stable est actuellement encore utilisé dans l'industrie [2].

2.1. Nitration de la cellulose avec de l'acide nitrique

La nitrocellulose (ou nitrate de cellulose) peut être obtenue par nitration de la cellulose grâce à une réaction d'estérification en présence d'acide nitrique. Cette réaction réversible et très exothermique peut être représentée de la façon suivante :

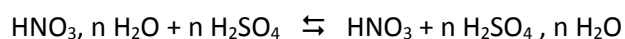


La réaction de nitration a lieu sans dissolution de la fibre cellulosique. Une étape d'absorption de l'acide nitrique dans la fibre précède le procédé de nitration et engendre une gélification à la surface

des fibres. Ce phénomène empêche la diffusion de l'acide au cœur des fibres et conduit à la formation d'un produit hétérogène. Ce procédé de nitration conduit à la synthèse de nitrocellulose ayant un faible taux de nitration. Pendant la seconde guerre mondiale, une étape de prétraitement de la cellulose avec des vapeurs saturées d'acide nitrique a été utilisée avant la nitration avec l'acide nitrique concentré ce qui a permis de prévenir la formation de la gélatinisation de la fibre à la surface. Dans ces conditions, les taux de nitration obtenus peuvent atteindre 13,8 % [2].

2.2. Nitration à partir d'un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique

La nitration de la cellulose peut également avoir lieu en présence d'un mélange sulfo-nitrique. Dans ces conditions, l'acide sulfurique se comporte comme un agent déshydratant. La réaction suivante se produit :



Or, la nitration des celluloses est plus favorable en utilisant de l'acide nitrique anhydre. Des travaux réalisés par Lunge et coll. ont permis de déterminer le ratio (acide nitrique : acide sulfurique : eau) optimal permettant d'atteindre le taux de nitration le plus élevé. Le ratio molaire optimal est de 2 : 3 : 3. L'augmentation du pourcentage d'eau dans le milieu entraîne une diminution du taux de nitration obtenu sur la nitrocellulose en fin de réaction. Cependant, la réaction de nitration peut avoir lieu en milieu anhydre conduisant alors à des temps de réaction plus élevés. La vitesse de la réaction peut également être ralentie en augmentant la quantité d'acide sulfurique dans le mélange. Les ratios optimums acide sulfurique : acide nitrique sont compris entre 3 : 1 et 1 : 1. L'augmentation de la quantité d'acide sulfurique dans le mélange conduit à la formation d'esters sulfuriques de cellulose hautement instables [2].

2.3. Nitration de la cellulose à partir d'un mélange d'acide nitrique et d'acide phosphorique

Le procédé de synthèse de la nitrocellulose à partir d'un mélange d'acide nitrique et d'acide phosphorique conduit à la formation de nitrocelluloses hautement nitrées (jusqu'à 13,7 % d'azote). Le ratio acide nitrique : acide phosphorique permettant l'obtention d'un taux de nitration optimal est compris entre 3 : 1 et 1 : 1. Ce procédé de nitration ne conduit pas à la formation d'esters phosphoriques et la nitrocellulose obtenue est très stable. Ce procédé de synthèse n'a pas été développé à l'échelle industrielle car le taux de nitration maximal atteint reste limité (< 13,7 %) et surtout à cause du pouvoir corrosif de l'acide phosphorique dans les installations industrielles [2].

2.4. Nitration avec un mélange d'acide nitrique et d'acide acétique

Ce procédé de synthèse grâce à un mélange d'acide nitrique et d'acide acétique permet d'obtenir des taux de nitration extrêmement élevés (supérieurs à 14 %). Ce procédé nécessite une étape de stabilisation de la nitrocellulose obtenue. La stabilisation est réalisée par extraction du produit avec un alcool porté à ébullition. L'utilisation de ce procédé de nitration peut conduire à la formation de nitrates d'acétyle qui présentent un caractère explosif à haute température [2] .

2.5. Nitration de la cellulose avec un mélange d'acide nitrique et de solvants organiques

Ce procédé de synthèse est réalisé à partir d'un mélange d'acide nitrique et de solvants organiques tels que le tétrachlorométhane, le nitrate de méthyle ou le chloroforme. Dans ces conditions, les taux de nitration obtenus sont élevés. Des travaux réalisés par Turngren en 1983 [9] ont permis de montrer que ce procédé de synthèse en présence de tétrachlorométhane n'entraîne pas la dégradation de la chaîne polymère et de la structure fibreuse de la fibre de bois utilisée comme matière première. Cette propriété présente un intérêt lorsque la résistance mécanique de la nitrocellulose obtenue doit être contrôlée [2].

2.6. Stabilisation de la nitrocellulose

Après le procédé de nitration de la cellulose, il s'en suit une étape de stabilisation du produit final en vue de réaliser son stockage. Cette étape de stabilisation permet l'élimination des acides utilisés lors du procédé de nitration. Cette étape peut être réalisée par centrifugation ou par lavage à contre-courant de la fibre. Une étape de hachage mécanique de la nitrocellulose est parfois réalisée afin de diminuer la longueur de la fibre. Les fibres alors obtenues peuvent être portées à ébullition en présence de carbonate de calcium pour permettre l'élimination totale des acides utilisés lors du procédé. Cette étape conduit également à une diminution de la viscosité de la solution. Enfin, une dernière étape de lavage à l'eau est réalisée permettant l'homogénéisation du produit. La quantité d'eau présente dans le produit final est réduite à environ 30 % par centrifugation de la fibre permettant le stockage et le transport de la nitrocellulose sans danger [2].

2.7. Récapitulatif des différents procédés de nitration de la cellulose

L'évolution du procédé de synthèse de la nitrocellulose au cours du temps est résumée dans le Tableau I-II-5. Pour tous les procédés de synthèse, la matière première utilisée est le bois ou le coton.

Année	Méthode de préparation de la nitrocellulose	Auteur	Résultats obtenus	Taux de nitruration de la nitrocellulose
1832	HNO ₃ (85% v/v)	Braconnot	Nitrocellulose instable et hétérogène	4-5 % maximum
1846	Mélange HNO ₃ et H ₂ SO ₄ (proportions optimales 1 : 1 à 1 : 3)	Schönbein	Nitrocellulose stable	Jusqu'à 13,9 %
1884	Suspension de nitrocellulose dans un mélange alcool/éther ou acétone	Vieille	Nitrocellulose utilisée dans les poudres sans fumée	-
1890	Mélange de nitrocellulose et de nitroglycérine	Abel et Nobel	Amélioration dans la fabrication de la nitrocellulose contenue dans les nouvelles poudres sans fumée	-
1930	Mélange de HNO ₃ et de solvants organiques (CCl ₄ , CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ et CH ₃ NO ₃)	-	Nitrocellulose stable ayant une très grande résistance mécanique	Jusqu'à 13,4 %
1940	Prétraitement avec des vapeurs saturées de HNO ₃ puis HNO ₃ (98% v/v)	-	Nitrocellulose stable et homogène	13,6-13,8 %
-	Mélange de HNO ₃ et de H ₃ PO ₄ (proportions optimales HNO ₃ : H ₃ PO ₄ 3 : 1 à 1 : 1)	-	Nitrocellulose très stable	Jusqu'à 13,7%
-	Mélange de HNO ₃ et CH ₃ COOH	-	Nitrocellulose instable à haute température	> 14%

Tableau I-II-5 : Evolution historique des procédés de synthèse de la nitrocellulose. D'après [1].

Le procédé de nitration le plus couramment utilisé dans l'industrie est celui dans lequel l'agent de nitration est constitué d'un mélange d'acide sulfurique et d'acide nitrique.

3. Procédé industriel de production de la nitrocellulose

Le procédé industriel de synthèse de la nitrocellulose (utilisé par la société Dow Wolff Cellulosics) [9] est décrit en Figure I-II-3.

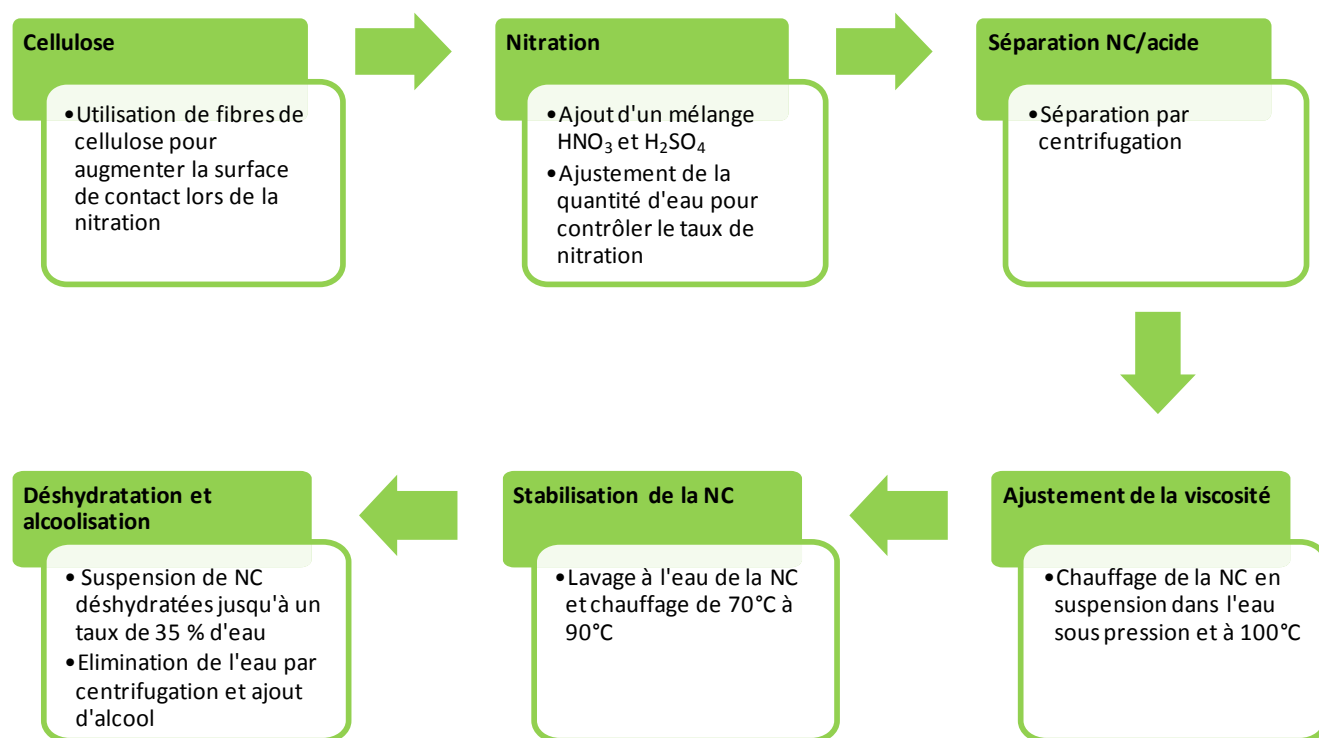


Figure I-II-3 : Procédé de fabrication de la nitrocellulose d'après [10]. NC : nitrocellulose.

Lors de l'étape de nitration, en faisant varier la quantité d'eau présente dans l'acide nitrique, le taux de nitration de la nitrocellulose peut être contrôlé car la réaction d'estérification se produisant est un équilibre.

L'ajustement de la viscosité de la solution de suspension de nitrocellulose obtenue est réalisé par chauffage. Cette étape permet de réduire la longueur des chaînes polymères. Pour obtenir des nitrocelluloses avec une masse moléculaire élevée (viscosité élevée) l'étape de chauffage est très rapide. Dans le cas contraire, pour obtenir des nitrocelluloses de faibles masses moléculaires (faible viscosité), la durée du chauffage appliquée est longue.

L'étape de stabilisation permet l'élimination des esters sulfuriques formés lors de l'étape de nitration qui sont moins stables que la nitrocellulose.

4. Décomposition de la nitrocellulose

4.1. Dégradation biologique

Les procédés de dégradation de la nitrocellulose en milieu biologique ont particulièrement été étudiés pour le retraitement des déchets contenant de la nitrocellulose en effectuant une dénitrification, ceci, dans l'objectif de transformer la nitrocellulose en un matériau non explosif. Dans le cas d'une dénitrification totale, la nitrocellulose obtenue synthétiquement et initialement résistante à la biodégradation est transformée en un substrat (cellulose) dégradable par les microorganismes [11].

La biotransformation de la nitrocellulose dans des milieux réducteurs de culture en aérobie en présence de nitrates ou de sulfates a été étudiée par Freedman et coll. dans l'objectif de transformer ce polymère en matière non-explosive [12]. La variation du taux de nitration de la nitrocellulose a été suivie grâce à un procédé de digestion de la nitrocellulose en présence d'acide sulfurique à froid permettant la libération de nitrates. Les ions nitrate formés sont alors quantifiés en présence de l'ion ferreux en milieu acide sulfurique. D'après les résultats obtenus, l'ajout d'un donneur d'électron aux milieux de cultures est nécessaire pour permettre la dénitrification. Pour les deux milieux de culture, une diminution de 1 % du taux de nitration a été obtenue par rapport aux taux de nitration des nitrocelluloses initiales (passage d'un taux de nitration de 13,1-13,2 % à 12,2-12,4%). L'analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) met en évidence un enrichissement de la structure polymère en groupements hydroxyle après traitement uniquement en milieu sulfurique. Ceci est lié à l'hydrolyse des fonctions esters. Les propriétés explosives des nitrocelluloses avant et après traitement ont ensuite été comparées. Les nitrocelluloses traitées présentent une réactivité à l'explosion plus faible mais sont toujours considérées comme explosives.

Petrova et coll. ont mis en évidence la biotransformation de la nitrocellulose en présence de bactéries issues de *Desulfovibrio genus* [13]. L'objectif de cette étude était de voir si la nitrocellulose subissait une transformation en milieu sulfidogénique et d'étudier l'influence de la présence de nitrocellulose sur la croissance des bactéries. Les essais ont été menés en introduisant dans les milieux de culture de la nitrocellulose ayant un taux de nitration de 11,85 %. Une méthode gravimétrique a permis de mettre en évidence une diminution de la masse de nitrocellulose (comprise entre 4,9 et 9,3 %) selon le type de bactérie présente dans le milieu. Le taux de transformation obtenu est compris entre 46 et 73 mg de nitrocellulose par mg de protéine bactérienne en 10 jours. Le taux de nitration de la nitrocellulose restante dans le milieu après biotransformation est diminué de 2 à 12 % selon la souche bactérienne utilisée. La transformation conduit à la présence de nitrates dans le milieu de culture. De plus, l'effet inhibiteur de la nitrocellulose au début de la croissance bactérienne en milieu lactate/sulfate a été démontré (taux de croissance 1,5 fois plus faible en présence de nitrocellulose).

La FTIR a été utilisée par Tarasova et coll. pour étudier la modification de la molécule de nitrocellulose (taux de nitration > 11 %) en présence de la bactérie *Desulfovibrio desulfuricans* 1388 [14]. Les analyses par FTIR ont permis de démontrer la dégradation biologique de la nitrocellulose après soixante jours d'incubation. Les spectres FTIR obtenus sont présentés en Figure I-II-4.

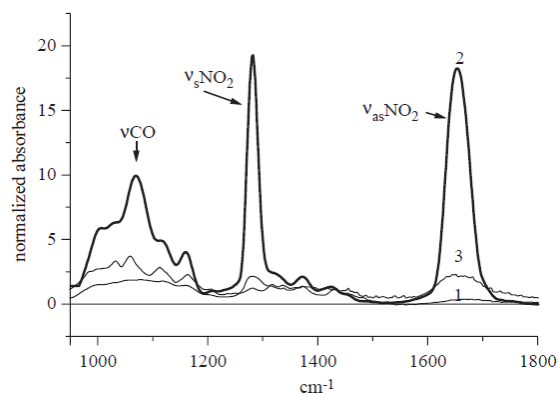


Figure I-II-4 : Spectres FTIR obtenus après mise en pastille dans du KBr de (1) cellulose naturelle ; (2) nitrocellulose ; (3) précipité obtenu après 60 jours d'incubation en présence de *D.desulfuricans*. D'après [14].

Le spectre FTIR sur le précipité obtenu après traitement de la nitrocellulose par *D.desulfuricans* est semblable à celui de la cellulose démontrant alors que la nitrocellulose subit une biotransformation en présence de cette bactérie. La Résonance Magnétique Nucléaire du ¹³C a également été utilisée pour mettre en évidence la dénitrification de la nitrocellulose par cette même bactérie [15].

Cinq champignons (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Coprinus cinereus*, *Trichoderma reesi* et *Chaetonium elatum*) ont été testés par Auer et coll. en tant qu'agent de dégradation de la nitrocellulose (taux de nitration 13,4 et 11,9 %) [16]. Ces champignons ont été placés en présence de nitrocellulose dans des milieux de culture contenant différentes sources de carbone et d'hydrogène. Une méthode spectroscopique (après hydrolyse acide des groupements nitro de la nitrocellulose et réaction avec la diphenylamine) a été utilisée pour quantifier la nitrocellulose au cours du temps. Après 28 jours d'incubation, la plus forte diminution (43 %) de la quantité de nitrocellulose a été observée avec *Chaetonium elatum* dans un milieu contenant uniquement comme source d'azote la nitrocellulose et comme source de carbone la carboxyméthylcellulose. Avec les autres espèces de champignons, des diminutions de la quantité de nitrocellulose comprises entre 10 et 37 % ont été obtenues.

D'autres auteurs ont étudié également la dégradation de la nitrocellulose par des champignons lignicoles tels que *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* et *Trichoderma reesei* [17]. Dans ces travaux, une méthode de quantification de la nitrocellulose après hydrolyse en présence d'acide sulfurique et réaction avec la diphenylamine par spectrophotométrie d'absorption UV-visible (LOD 5-30 µg) et une

méthode d'extraction de la nitrocellulose (rendement 85 %) dans les sols ont été développées. Différents milieux de culture des champignons ont été testés (paille, blé, sciure) pour obtenir la dégradation la plus importante de la nitrocellulose. La paille est le milieu permettant d'obtenir la meilleure dégradation : après 28 jours de culture la concentration de la nitrocellulose dans le milieu est inférieure à la limite de détection. De plus, il a été démontré par les auteurs que la mise en présence de nitrocelluloses explosives avec des cellulases commerciales seules ne conduit pas à la dégradation du polymère [17].

4.2. Dégradation mécanique

La dégradation mécanique de la nitrocellulose par broyage ou coupure est un procédé utilisé dans l'industrie pour diminuer la taille des chaînes polymères. Au cours de ce procédé, la structure de la nitrocellulose est modifiée et le degré de polymérisation diminue. La dégradation mécanique permet, en plus de la coupure des chaînes polymères, d'augmenter la solubilité de la nitrocellulose ainsi que sa capacité à absorber l'humidité [5].

La stabilité mécanique de la nitrocellulose a été évaluée par Vyazovkin et coll. suite à une analyse dynamique mécanique combinée avec la spectrométrie de masse (DMA-MS) [18]. Au cours de ces travaux, la dégradation d'un film de nitrocellulose soumis à une déformation oscillatoire et obtenu à partir de fibres de nitrocellulose ayant un taux de nitration de 12,4 % a été étudiée. Les influences de la température (150 et 160°C) et de la fréquence d'excitation (100 à 600 Hz) sur le procédé de dégradation ont été étudiées. Le processus de dégradation n'est observé qu'à des températures voisines de 150°C. La décomposition de la nitrocellulose est mise en évidence par la présence d'un pic intense en spectrométrie de masse à $m/z = 30$ (ions NO^+ et CH_2O^+) et $m/z = 44$ (ions $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}^+$, CO_2^+ et N_2O^+). L'ajout de diphénylamine (2 % massique) augmente la résistance de la nitrocellulose à la dégradation mécano-chimique. En effet, la diphénylamine est un stabilisant couramment utilisé dans la formulation des poudres propulsives qui permet de capter les produits de dégradation nitrés libérés par la nitrocellulose (comme NO_2 et HNO_3) en formant des nitramines [18].

4.3. Dégradation ultrasonore

Cropek et coll. ont étudié les effets des ultrasons sur les nitrocelluloses [19]. Une très faible dénitration a été constatée après 5 h de sonolyse à 20 kHz.

4.4. Décomposition thermique

La nitrocellulose est relativement stable sous sa forme la plus pure à des températures modérées. La décomposition thermique a lieu à partir de 100°C. L'étape initiale de la décomposition correspond à la rupture des liaisons O-NO₂ qui est ensuite suivie par une série de réactions d'oxydation. La réaction est auto-catalysée par la production de dioxyde d'azote responsable du phénomène d'auto-ignition de la nitrocellulose [5].

Le processus de fusion de la nitrocellulose a été étudié pour des nitrocelluloses de taux de nitration compris entre 14,1 % et 11,9 %. Les températures de fusion obtenues sont plus élevées que les températures de décomposition. Le point de fusion de la nitrocellulose correspond donc à celui de la nitrocellulose initiale et de ces produits de décomposition [20].

Le mécanisme de combustion spontanée de la nitrocellulose (taux de nitration de 12 %) a été étudié par Katoh et coll. à 120°C pendant 35 h [21]. En effet, ce mécanisme de combustion spontanée a causé de nombreux accidents. Cette étude consistant à mesurer la pression et à étudier le comportement thermique de la nitrocellulose a été réalisée dans plusieurs atmosphères ambiantes : 4,7 % (v/v) NO₂/air ou un mélange O₂/N₂ avec différentes pressions partielles de O₂. Lors de l'exposition de la nitrocellulose en présence d'air sec, une diminution de la pression de O₂ en plus de la génération de chaleur a été observée. Ceci a été expliqué par une réaction d'auto-oxydation de premier ordre. Pour les deux atmosphères testées, la chaleur libérée par la réaction est similaire (450 J/g en atmosphère NO₂/air et 460 J/g en atmosphère O₂/N₂) et évolue de façon linéaire avec le temps de stockage. Cependant, selon l'atmosphère environnante, les valeurs de constante de vitesse ($k = 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en milieu NO₂/air et $k = 7,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ en milieu O₂/N₂) et les périodes d'induction obtenues sont différentes (3,4 h en milieu NO₂/air et 9,2 h en milieu O₂/N₂). Un mécanisme de combustion spontanée de la nitrocellulose dans lequel les groupements NO₂ ont une forte influence sur l'initiation du procédé mais peu d'influence sur les produits d'autoxydation a été proposé. Cette proposition a été confirmée par le fait qu'en augmentant la quantité de nitrocellulose (et par conséquent le nombre de groupement NO₂) le temps d'induction diminue sans aucune modification de la chaleur libérée.

La décomposition thermique de la nitrocellulose (taux d'azote : 13,15 %) a été également étudiée dans des environnements particuliers (air, hélium et argon) [22]. L'énergie d'activation de la réaction semble dépendre de la nature du gaz environnant. Cette dépendance a été expliquée par une possible oxydation de la nitrocellulose en contact avec l'air qui ne peut pas se produire sous atmosphère d'hélium. Sous air, une augmentation de la pression (de 0,1 à 1,8 MPa) conduit à une diminution de la température de début de décomposition de la nitrocellulose. Sous argon, le phénomène inverse est observé : une augmentation de la pression (de 0,27 à 1,91 MPa) permet d'améliorer la stabilité thermique de la nitrocellulose.

La stabilité thermique de la nitrocellulose a été étudiée par Pourmortazavi et coll. [23] L'objectif de ces travaux était de mettre en évidence l'influence du taux de nitration de la nitrocellulose sur le comportement thermique de celle-ci. Pour cela, quatre types de nitrocellulose ayant un taux de nitration différent ont été analysées (12,5-12,9-13,5 et 13,9 % d'azote). Les résultats obtenus mettent en évidence l'influence du taux de nitration sur la dégradation thermique de la nitrocellulose. En effet, la température de décomposition diminue lorsque le taux de nitration augmente (Figure I-II-5).

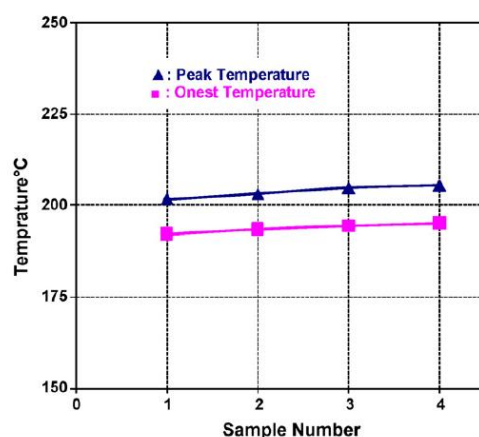


Figure I-II-5: Effet du taux de nitration de la nitrocellulose sur la température de début de décomposition et sur la température de décomposition. Masse de nitrocellulose utilisée : 3 mg. Échantillons de nitrocellulose : échantillon 1 : taux de nitration de 13,9% ; échantillon 2 : taux de nitration de 13,5% ; échantillon 3 : taux de nitration de 12,9 % et échantillon 4 : taux de nitration de 12,5 %. Conditions d'analyse: chauffage de 50 à 400°C avec un gradient de température de 5°C/min sous atmosphère d'hélium à un débit de 50 mL/min. D'après [23].

La rampe de température (5, 10, 15 et 20°C/min) lors de la montée en température a également une influence sur la température de décomposition (192-209°C) de la nitrocellulose. L'augmentation de la rampe de température utilisée conduit à une élévation de la température de décomposition du produit. Les principaux gaz émis lors de la décomposition sont H₂O, CO, NO et CO₂ et le produit majoritaire de décomposition est le CO. Ont également été déterminés les paramètres cinétiques de la loi d'Arrhenius de la réaction de décomposition tels que l'énergie d'activation (155 kJ/mol) par la méthode Ozawa et la valeur du facteur pré-exponentiel avec la méthode ASTM E698 pour la nitrocellulose la plus fortement nitrée et donc la plus instable. Les paramètres cinétiques ont été calculés en considérant que la cinétique de la réaction de décomposition est de premier ordre. Les analyses thermiques effectuées et les données cinétiques de la réaction de décomposition ont permis d'obtenir la température critique d'explosion (196°C) de la nitrocellulose ayant un taux d'azote de 13,9 % ainsi que le temps de demi-vie (5 ans à 50°C).

La valeur de température de décomposition d'une nitrocellulose hautement nitrée (200 °C pour une nitrocellulose ayant un taux de nitration de 14,14 %) obtenues par calorimétrie différentielle à

balayage modulée par Binke et coll. [24] (200°C) confirme les résultats obtenus par Pourmortazavi et coll. [23].

L'influence de la taille des particules sur la décomposition thermique de la nitrocellulose a été mise en évidence par Sovizi et coll. [25]. L'objectif de ces travaux était de comparer la stabilité thermique de micro- et nano-particules de nitrocellulose. Les particules de nitrocellulose étudiées avaient un taux de nitration de 13,9 % et leur taille a été évaluée par microscopie électronique à balayage (SEM). De même que dans les travaux de Pourmortazavi [23], les paramètres cinétiques (énergie d'activation et facteur pré-exponentiel) de la loi d'Arrhenius ont été déterminés. La température de décomposition de ces particules de nitrocellulose s'est révélée comprise entre 190 et 210 °C et diminue lorsque la taille des particules diminue. Les résultats obtenus pour les micro- et nano-particules de nitrocellulose confirment les résultats obtenus par Pourmortazavi et coll. [23] rappelés précédemment. Ces travaux montrent que les micro-fibres de nitrocellulose présentent une meilleure stabilité thermique que les nano-fibres de nitrocellulose. En effet, l'énergie d'activation, l'enthalpie, la température de décomposition et la température critique d'explosion sont plus élevées pour les micro-fibres.

Lin et coll. ont étudié l'énergie d'activation de la réaction correspondant à la dégradation thermique de la nitrocellulose [26]. Les influences du taux de nitration (13,6 - 11,55 %) de la nitrocellulose et de la rampe de montée en température (5 ou 10°C/min) sur l'énergie d'activation ont été considérées. Ils ont également montré que la présence de diphénylamine (0 – 3 % m/m) affecte la décomposition thermique d'une nitrocellulose contenant 13,6 % d'azote. L'énergie d'activation la plus faible a été obtenue pour la nitrocellulose sans diphénylamine et celle la plus élevée pour la nitrocellulose contenant 0,75 % (m/m) de diphénylamine.

La décomposition thermique de la nitrocellulose a été utilisée comme stratégie pour transformer cette matière explosive en produit inoffensif [27]. Dans ces travaux, deux types de nitrocelluloses explosives ont été étudiées (pâte et fibre) ayant des taux de nitration différents (13,5 et 13,1 %). Contrairement à ce qui a été rappelé précédemment, la décomposition thermique de la nitrocellulose ne serait pas influencée par la présence d'air (et donc de O₂) ni par l'eau contenue dans les échantillons. 3 températures de chauffage ont été testées (130, 140 et 150 °C). Une diminution plus rapide de la teneur en azote a été obtenue à la température de chauffage la plus élevée. Cependant, à cette température, les risques d'explosion sont nettement plus élevés. Le graphe représentant la perte de masse en fonction du taux de nitration de la nitrocellulose a été établi. Cependant, des pertes de masse plus importantes que la perte de masse théorique maximale correspondant au départ de tous les groupements NO₂ de la molécule ont été obtenues. Cette observation a été expliquée par la perte d'autres groupements lors de la décomposition thermique, démontrant ainsi qu'il n'y avait pas de

relation entre la perte de masse obtenue et le taux de nitration. Cette explication a été confirmée par la détection de CO₂ lors d'une étude de décomposition par chromatographie en phase gazeuse. La stabilité thermique des échantillons recueillis après la dégradation a été évaluée. Pour être utilisable en industrie, ce procédé de dégradation thermique devrait être réalisé à 150°C car à des températures plus faibles il est nettement plus long et par conséquent inadapté [27]. Un autre procédé thermique couramment utilisé pour détruire des stocks de nitrocellulose est l'incinération, qui consiste en une combustion contrôlée à très haute température (≥ 1000 °C) en présence d'un excès d'oxygène et qui conduit à un ensemble de gaz permanents légers [28]. L'identification des résidus obtenus, essentielle pour la sécurité de tels procédés, a été réalisée par couplage pyrolyse-chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (Py-GC-MS, voir plus loin, § 5.1.1).

4.5. Décomposition photochimique

Les radiations photochimiques peuvent entraîner la rupture des liaisons carbone-carbone de la nitrocellulose. La décomposition photochimique peut conduire à la rupture des chaînes polymères et induire des phénomènes de réticulation. Des coupures aléatoires des chaînes de nitrocelluloses (en solution dans l'acétate d'éthyle et dans le méthanol) par photo-décomposition ont été observées pour des nitrocelluloses faiblement et hautement nitrées. L'irradiation ultraviolette de la nitrocellulose provoque sa décomposition et une partielle dénitruration. La réaction de dénitruration se produisant conduit à la libération de dioxyde d'azote et d'acide nitrique. Le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, les gaz azotés et les oxydes d'azote sont les principaux produits de décomposition obtenus [5].

4.6. Décomposition alcaline

Les agents alcalins (hydroxyde de sodium ou de potassium) entraînent une décomposition de la nitrocellulose. Cette réaction n'est pas une simple réaction de saponification (dénitruration) régénérant la fonction alcool et formant des nitrates. Il s'agit d'une décomposition plus complexe conduisant à la formation d'ions nitrite et de produits d'oxydation. Les principaux produits de décomposition obtenus après l'hydrolyse sont des nitrites, des nitrates, de l'ammoniac, des oxydes d'azote, du cyanure, du monoxyde et dioxyde de carbone, des acides organiques (oxalique, malique, glycolique, trihydroxyglutarique, déhydroxybutyrique, malonique et tartronique) , des sucres, des celluloses modifiées et de la nitrocellulose partiellement dénitrée [5].

La cinétique de la réaction d'hydrolyse de la nitrocellulose (ayant un taux de nitration entre 12,2 et 13,5 %) en milieu alcalin a été étudiée par Christodoulatos et coll. [29]. Le mécanisme de formation des ions nitrite et nitrate proposé est donné en Figure I-II-6.

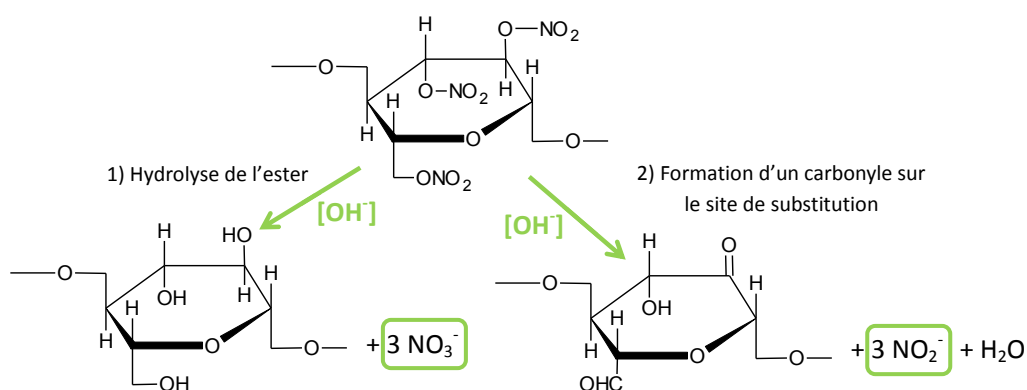


Figure I-II-6: Mécanisme de formation des ions nitrate et nitrite en milieu alcalin. D'après [29].

Les études cinétiques ont été réalisées à partir de solutions contenant 1 % (massique) de nitrocellulose dans des solutions de soude de différentes concentrations (entre 0,1 et 15 % massique, soit entre 0,025 et 3,75 M) et à différentes températures (30, 50, 70 et 90°C). Tout au long de la réaction, la concentration de nitrocellulose résiduelle a été évaluée par mesure de la quantité de matière en suspension. Les profils de concentration obtenus dans les différentes conditions sont présentés en Figure I-II-7.

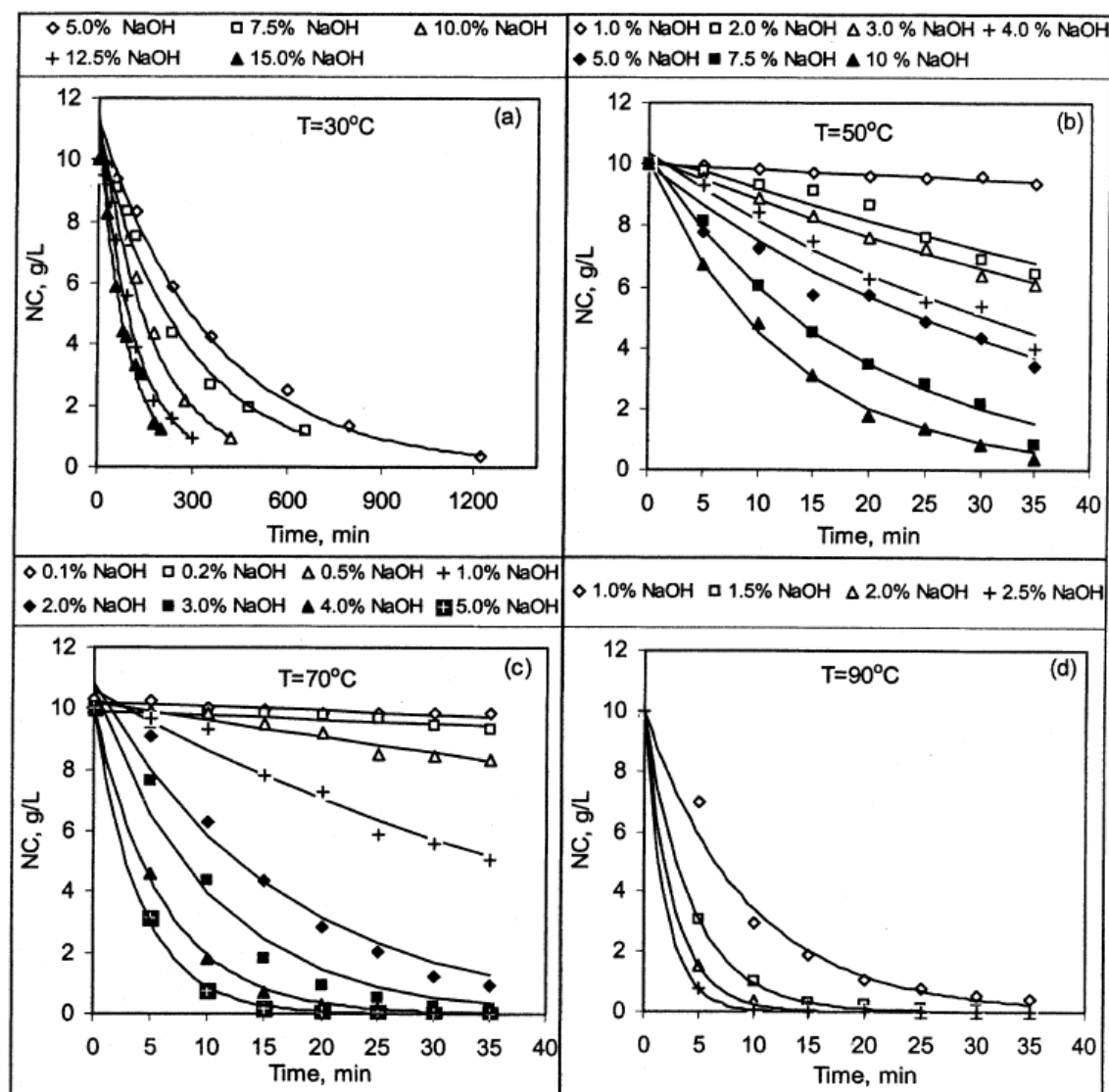


Figure I-II-7 : Profils de concentration de nitrocellulose obtenus lors de son hydrolyse alcaline avec différentes concentrations de soude pour différentes températures (a) 30°C, (b) 50°C, (c) 70°C et (d) 90°C. D'après [29].

A l'issue des réactions, 92 % de la nitrocellulose sont convertis en ions nitrate et nitrite (les 8 % restant sont perdus ou transformés en d'autres composés). Le rendement obtenu est d'autant plus élevé que la concentration en soude et la température sont élevées. Le rapport des concentrations massiques nitrite/nitrate obtenu après hydrolyse est de 3 :1. Il est indépendant des conditions d'hydrolyse. La régression linéaire obtenue à partir des concentrations en ions nitrite et nitrate libérés est présentée en Figure I-II-8.

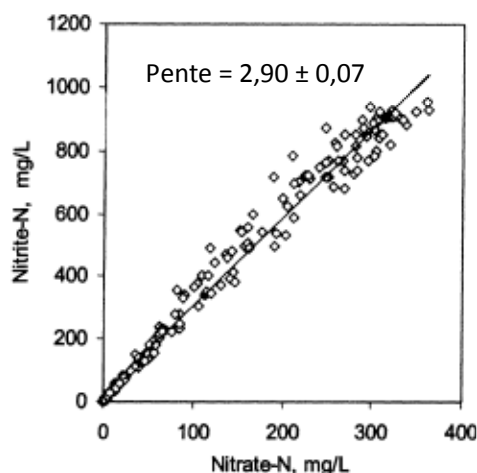


Figure I-II-8 : Régression linéaire obtenue à partir des concentrations massiques en ions nitrite et nitrate libérés lors d'hydrolyses alcalines pour toutes les conditions d'hydrolyse testées (161 données). D'après [29].

Su et coll. ont montré que le procédé d'hydrolyse basique était une alternative intéressante pour détruire sans danger des déchets de nitrocellulose [30]. Ce procédé pourrait donc remplacer les procédés dangereux couramment utilisés pour la destruction qui consiste à les faire détoner ou à procéder à leur incinération. Les effets de la concentration de la solution de soude et de la durée d'hydrolyse sur le procédé de transformation ont été étudiés. Les essais ont été réalisés sur des nitrocelluloses ayant un taux de nitration de 12,2 %. Un taux de transformation de 90 % a été obtenu en 35 min à 70°C avec une solution de soude à 0,5 M. A l'issue de la réaction, le rapport entre les concentrations en ions nitrite et nitrate obtenu est de 3, confirmant ainsi les résultats obtenus par Christodoulatos et coll. [29]. Ce rapport a été trouvé indépendant du rendement de la réaction et de la concentration de la soude utilisée. De même, en 2011, Raeisi et coll. ont développés une méthode d'hydrolyse alcaline sur des déchets de nitrocellulose afin de les transformer en matière non-explosive [31]. Néanmoins, l'étude a été réalisée sur des nitrocelluloses non-explosives ayant un taux de nitration de 8,33 %. Dans ces travaux, les effets de la concentration en agent alcalin (0,5-1-1,5-2-2,5 M) et de la température (25, 45, 55, 65 et 85°C) sur le taux de transformation et sur la dégradation de la structure ont été étudiés. Les conditions optimales ont été obtenues avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1,5 M et à une température de 55°C. A des températures plus basses (température ambiante) la réaction de dénitration est très lente. À des températures et à des concentrations en soude plus élevées un possible clivage de la structure cellulosique peut avoir lieu, conduisant à la formation de glucose. La concentration en azote libéré lors de la réaction a été mesurée au cours de la réaction toutes les 15 min. A l'issue de la réaction d'hydrolyse, la solution est neutralisée avec une solution d'acide phosphorique à 40%. Ces travaux ont permis de montrer que la température est le paramètre le plus influent sur la dégradation de la structure de la cellulose.

4.7. Décomposition en milieu acide

La décomposition de la nitrocellulose en milieu acide a été mise en évidence grâce au procédé de fabrication. En effet, il a été démontré que l'acide résiduel provenant du procédé de nitration de la cellulose peut rendre instable la nitrocellulose et entraîner sa décomposition. Cette décomposition conduit au clivage de la structure cellulosique et accélère le procédé d'hydrolyse. La dénitration de la nitrocellulose en présence d'acides, qui se produit simultanément, est nettement plus longue qu'en présence de bases. En théorie, tous les acides minéraux peuvent être utilisés. Cependant, l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique ont été les plus utilisés pour des raisons de coût. Le glucose est le produit majoritairement obtenu après l'hydrolyse acide [5].

5. Techniques d'analyse de la nitrocellulose

Actuellement, de nombreuses techniques d'analyse des composés présents dans les explosifs (nitroglycérine, trinitrotoluène, pentrite...) ont été publiées. Cependant, à ce jour, très peu de travaux ont été réalisés sur la caractérisation et la détermination de nitrocellulose dans les explosifs. Ceci est lié aux facteurs suivants [1,32,33] :

- la masse moléculaire très élevée, et la forte polydispersité,
- la complexité chimique et structurale de cette macromolécule, liée à la variabilité du taux de nitration des chaînes et des positions nitrées,
- les difficultés de solubilisation des échantillons,
- les propriétés spectrales limitées,
- le manque d'étalons commerciaux de nitrocellulose ayant des taux de nitration différents et bien définis,
- la complexité de la formulation inhérente aux explosifs, qui contiennent de nombreux additifs, engendrant le développement de méthodes d'extraction complexes,
- la maîtrise des risques liés à sa manipulation.

De nombreux travaux ont porté sur la caractérisation de la nitrocellulose présente dans les formulations explosives, notamment sur la mesure de ses propriétés physico-chimiques (viscosité, indice de réfraction, distribution de masse moléculaire) par chromatographie d'exclusion stérique. La spectrométrie de masse et la spectrométrie infrarouge ont été les principales techniques utilisées pour caractériser les produits libérés après la pyrolyse, la calcination ou combustion du polymère. En effet, l'étude des propriétés thermiques est très importante puisque la nitrocellulose est brûlée lorsqu'elle est utilisée comme poudre propulsive. Les paramètres cinétiques (énergie d'activation, enthalpie,

température de décomposition thermique et critique d'explosion) de la réaction de décomposition thermique ont été déterminés à partir d'analyses calorimétriques différentielles à balayage (DSC), thermogravimétriques (TGA) et thermodifférentielles (DTA).

La caractérisation de la nitrocellulose présente un grand intérêt d'un point de vue criminalistique et juridique, car la mise en évidence de sa présence sur des résidus d'explosion permettrait d'avoir des informations sur le type d'explosif utilisé. En effet, la nitrocellulose est présente dans les formulations de poudres propulsives de type simple base, double base et triple base.

Le développement de nouvelles méthodes d'analyse permettant de mettre en évidence la présence de nitrocellulose présente également un intérêt dans le domaine environnemental. En effet, la fabrication d'explosifs ou d'autres composés (vernis, peintures...) constitués de nitrocelluloses entraîne de nombreux problèmes de contamination des sols et de l'eau par la nitrocellulose notamment à cause des déchets générés lors de la fabrication.

5.1. Techniques d'analyse chromatographiques

La chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse ont été utilisées pour analyser la nitrocellulose. Cependant, la chromatographie en phase gazeuse a été principalement utilisée pour étudier les propriétés thermiques de ce polymère. La chromatographie en phase liquide est la technique de séparation la plus utilisée pour la détermination et la caractérisation des nitrocelluloses.

5.1.1. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour étudier le comportement thermique de la nitrocellulose, notamment après pyrolyse et prévoir ainsi les produits formés dans les incinérateurs (voir § 4.4, p. 43). La pyrolyse est une technique de décomposition thermique d'une substance à analyser à haute température (≥ 500 °C) et en général en absence d'oxygène en un grand nombre de produits gazeux et parfois solides. Elle est le plus souvent combinée à une séparation des résidus par chromatographie en phase gazeuse et à une identification par spectrométrie de masse (Py-GC-MS). Cette méthode d'analyse est couramment utilisée pour les composés ne pouvant pas être injectés directement en GC (polymères, peintures, huiles, microorganismes et sols).

La GC-MS a été utilisée par Cropek et coll. afin d'identifier les produits obtenus après la pyrolyse d'un explosif de type double base (AA2) contenant principalement de la nitrocellulose (taux de nitration 13,4 %) et de la nitroglycérine [28]. La pyrolyse a été effectuée sur 2-6 mg de poudre propulsive ainsi que sur ses constituants principaux pris individuellement (notamment la

nitrocellulose), afin de déterminer la provenance des gaz de pyrolyse. Etant donné la variété des masses molaires des produits de pyrolyse obtenus (LMW : low molecular weight et HMW : high molecular weight), 2 méthodes d'analyse par GC ont été utilisées. Pour analyser les gaz LMW libérés après pyrolyse, il est utilisé une colonne PoraPLOT Q (50 m × 0,32 mm i.d. × 10 µm) et une programmation en température du four (40°C pendant 13 min puis une montée en température à 10°C/min jusqu'à 200°C puis 200°C pendant 60 min). La température de l'injecteur est fixée à 200°C et celle du détecteur à 280°C. Pour les analyses des gaz HMW, la séparation des composés est réalisée en utilisant une colonne HP-5MS (25 m × 0,20 mm i.d. × 0,33 µm) et également une programmation en température du four (40°C pendant 2 min puis une montée en température à 10°C/min jusqu'à 250°C puis 250°C pendant 7 min). La température de l'injecteur est fixée à 250°C et celle du détecteur à 280°C. Les deux méthodes sont réalisées en mode *splitless*. Le pyrogramme obtenu sur la nitrocellulose seule avec la méthode LMW est très similaire à celui obtenu pour la poudre propulsive. Les pyrogrammes obtenus avec la méthode LMW pour la poudre double base et pour la nitrocellulose sont présentés respectivement en Figure I-II-9 et en Figure I-II-10.

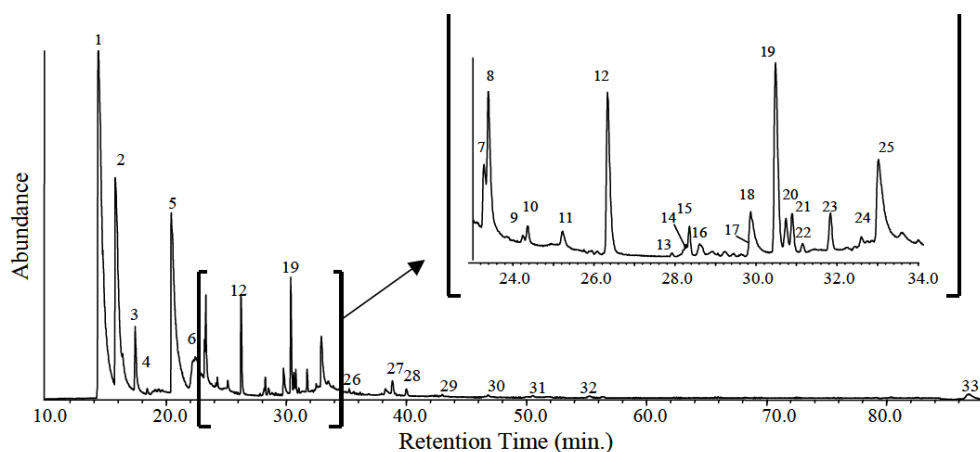


Figure I-II-9 : Pyrogramme de la poudre double base (méthode LMW). Conditions de pyrolyse : 40 à 150 °C à 20 °C/min ; 150 à 900 °C à 20 °C/ms ; maintien à 900 °C pendant 100 s. **Conditions chromatographiques :** colonne : 50 m × 0,32 mm x épaisseur du film : 10 µm ; phase stationnaire : PoraPLOT Q ; four : 40°C pendant 13 min puis jusqu'à 200°C avec une rampe de 10°C/min et maintien à 200°C pendant 60 min ; gaz vecteur : hélium, débit : non indiqué ; température de l'injecteur : 200°C ; température du détecteur : 280°C ; détection MS de 10 à 400 uma. **Identification des pics:** 1 : CO, NO (%A = 34,5% Normalisation Interne de Surface (NIS)) ; 2 : CO₂ (%A = 18,7%) ; 3 : acétylène (%A = 2,9%) ; 4 : éthane (%A = 0,2%) ; 5 : H₂O (%A = 16,1%) ; 6 : formaldéhyde (%A = 5,8%) ; 7 : cyanure d'hydrogène (%A = 0,9%) ; 8 : propène (%A = 3,1%) ; 9 : 1,2-propadiène (%A = 0,1%) ; 10 : 1-propyne (%A = 0,3%) ; 11 : méthanol (%A = 0,2%) ; 12 : éthylène oxyde (%A = 2,2%) ; 13 : formiate de méthyle (%A = 0,03%) ; 14 : 1-butène-3-yne (%A = 0,02%) ; 15 : 1,3-butadiène (%A = 0,4%) ; 16 : formamide (%A = 0,2%) ; 17 : acétonitrile (%A = 0,1%) ; 18 : acide formique (%A = 1,1%) ; 19 : 2-propénal (%A = 2,7%) ; 20 : furane (%A = 0,5%) ; 21 : propanal (%A = 0,6%) ; 22 : acétone (%A = 0,2%) ; 23 : 2-propènenitrile (%A = 0,7%) ; 24 : formiate de 2-propényle (%A = 0,1%) ; 25 : acide acétique (%A = 3,1%) ; 26 : 3-butène-2-one (%A = 0,3%) ; 27 : formiate de méthyle (%A = 0,6%) ; 28 : benzène (%A = 0,3%) ; 29 : acétate de 2-propényle (%A = 0,05%) ; 30 : pyridine (%A = 0,06%) ; 31 :

cyclopentanone (%A = 0,07%) ; 32 : 2-furancarboxaldéhyde (%A = 0,1%) ; 33 : phénol (%A = 0,8%).
D'après [28].

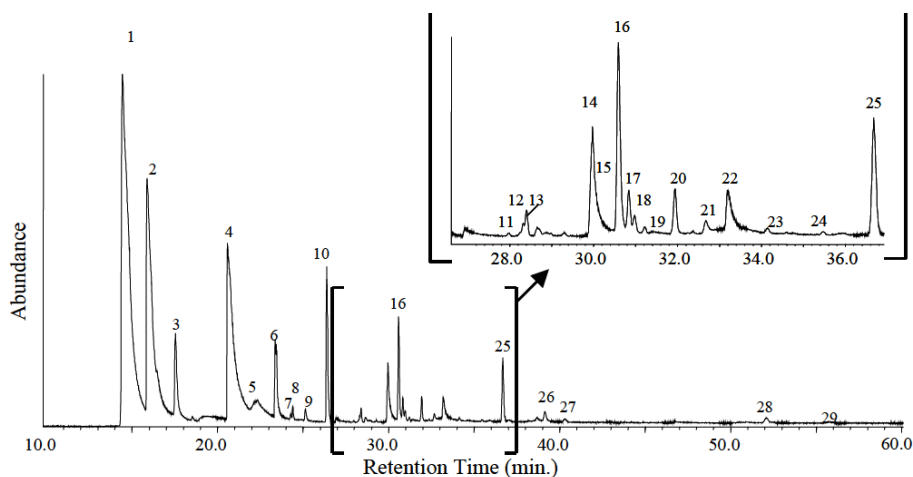


Figure I-II-10 : Pyrogramme de nitrocellulose (méthode LMW). Conditions de pyrolyse : 40 à 150 °C à 20 °C/min ; 150 à 900 °C à 20 °C/ms ; maintien à 900 °C pendant 100 s. Conditions chromatographiques : colonne : 50 m × 0,32 mm x 10 µm ; phase stationnaire : PoraPLOT Q ; four : 40°C pendant 13 min puis à jusqu'à 200°C avec une rampe de 10°C/min et maintien à 200°C pendant 60 min ; gaz vecteur : hélium, débit : non indiqué ; température de l'injecteur : 200°C ; température du détecteur : 280°C ; détection MS de 10 à 400 uma. Identification des pics : 1 : CO, NO, CH₄ (37,4% NIS) ; 2 : CO₂ , N₂O (21,4% NIS) ; 4 : H₂O (16,3% NIS) ; 5 : formaldéhyde (3,2% NIS) ; 6 : acide cyanhydrique, propène (3,0% NIS) ; 7, 8 : 1,2-propadiène (0,3% NIS) ; 9 : méthanol (0,3% NIS) ; 10 : éthylène oxyde (3,2% NIS) ; 11 : formiate de méthyle (0,01% NIS) ; 12 : 1-butène-3-yne (0,02% NIS) ; 13 : 1,3-butadiène (0,3% NIS) ; 14 : acétonitrile (2,0% NIS) ; 15 : acide formique (1,0% NIS) ; 16 : 2-propénal (2,1% NIS) ; 17 : furane (0,7% NIS) ; 18 : propanal (0,1% NIS) ; 19 : acétone (0,1% NIS) ; 20 : 2-propènenitrile (0,5% NIS) ; 21 : 2-propène-1-ol (0,3% NIS) ; 22 : acide acétique (1,2% NIS) ; 23 : propanenitrile (0,08% NIS) ; 24 : 3-butène-2-one (0,04% NIS) ; 25 : acétate d'éthyle (1,4% NIS). D'après [28].

Les principaux produits de pyrolyse obtenus avec la méthode LMW pour la poudre de type double base sont le CO, NO, CO₂ et H₂O (environ 70 %). Après l'analyse avec la méthode HMW le signal principalement obtenu provient de gaz légers (environ 90 %), dont certains ont également été identifiés avec la méthode LMW. Les principaux produits de dégradation identifiés après la pyrolyse de la formulation explosive ont été retrouvés sur les pyrogrammes de la nitrocellulose et de la nitroglycérine. En effet, ces résultats sont en accord avec la composition de la poudre propulsive contenant environ 88 % (massique) de ces deux constituants. Parmi les 65 produits identifiés sur les pyrogrammes (LMW et HMV) de la poudre double base, seulement 6 produits n'ont pas été retrouvés après pyrolyse des constituants analysés individuellement. Le formiate de méthyle et le 2-furancarboxaldéhyde sont deux produits de pyrolyse obtenus pour la poudre explosive caractéristiques de la présence de nitrocellulose [28,34]. Cette méthode a été utilisée par les mêmes auteurs pour étudier les effets de la sonolyse sur la nitrocellulose (voir § 4.3), à partir de l'analyse des produits de dégradation [19].

La même équipe de chercheurs a caractérisé par GC-MS les sous-produits obtenus lors de l'incinération de cette même poudre propulsive (AA2) constituée principalement (90%) de nitrocellulose et de nitroglycérine. Contrairement à ce qui pourrait être attendu, les sous-produits d'incinération obtenus ne proviennent pas des constituants principaux de la poudre mais des additifs présents minoritairement [35].

La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée également par Katoh et coll. lors d'une étude du mécanisme de combustion spontanée de la nitrocellulose (taux de nitration de 12 %) au cours de son stockage pour analyser le gaz ambiant présent dans l'enceinte [21].

5.1.2. Chromatographie en phase liquide

Parmi les techniques d'analyse en chromatographie en phase liquide, la chromatographie d'exclusion stérique est la plus utilisée pour l'analyse des nitrocelluloses. Par ailleurs, des analyses ont déjà été effectuées par chromatographie de partage à polarité de phases inversée ainsi que par chromatographie ionique.

5.1.2.1. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique d'analyse très utilisée pour déterminer les paramètres polymères de la nitrocellulose comme la masse molaire moyenne en nombre (M_n), en masse (M_w), la conformation structurale et les propriétés physico-chimiques (viscosité et indice de réfraction). Les différents travaux effectués avec cette technique ont été réalisés en utilisant dans un premier temps une simple détection (réfractomètre), ce qui nécessite dans ce cas l'utilisation d'étalons analytiques comme le polystyrène pour déterminer les paramètres polymères, mais on peut être réservé quant au choix de l'étalon. Les nitrocelluloses ont également été analysées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une triple détection (réfractomètre, viscosimètre et détecteur à diffusion de lumière) par Heinzmann et coll. [36]. Ces travaux mettent en évidence l'avantage de ces modes de détection couplés qui permettent de déterminer les paramètres polymères sans l'utilisation d'étalons. En effet, il n'existe pas dans le commerce d'étalons de nitrocellulose ayant des paramètres polymères connus. Les propriétés structurales de la nitrocellulose ont été comparées à des étalons de polystyrène en traçant le graphe de Mark-Houwink représentant le logarithme de la viscosité intrinsèque en fonction du logarithme de M_w pour les 2 composés. Les graphes obtenus ont permis de montrer que la nitrocellulose présente une structure plus ouverte et plus étendue que le polystyrène, en raison de la pente obtenue qui est plus élevée pour la nitrocellulose.

La chromatographie d'exclusion stérique associée à une triple détection et à une simple détection a également été utilisée par Mac Donald et coll. pour caractériser des nitrocelluloses [37]. Dans ces travaux, plusieurs types d'étalons de polymères ont été utilisés (polystyrène, polyméthylméthacrylate et polytétrahydrofurane) dans le but d'obtenir les masses molaires moyennes en masse de la nitrocellulose. Les résultats obtenus (pour la détermination de M_n et M_w) suite aux analyses avec une simple et une triple détection sont différents. De plus, les résultats obtenus en utilisant différents étalons mettent en évidence l'influence de la nature de l'étalon utilisé sur la masse molaire moyenne en masse obtenue (M_w). Les valeurs obtenues en utilisant les étalons de polytétrahydrofurane sont les valeurs les plus proches de celles obtenues en utilisant la triple détection.

Des travaux réalisés par Deacon et coll. ont permis d'étudier la reproductibilité des résultats obtenus par chromatographie d'exclusion stérique pour différents échantillons de nitrocellulose ayant des taux de nitration différents (explosives et non-explosives) [38]. Ces résultats ont mis en évidence une faible reproductibilité des valeurs obtenues (pour M_n et M_w) lorsque l'analyse est réalisée par différents opérateurs. Cependant, une excellente reproductibilité est obtenue lorsqu'il n'y a pas de changement d'analyste en répétant l'analyse pendant 3 mois. Il a également été montré que la masse molaire moyenne en masse obtenue dépend du taux d'humidité (eau ou solvant organique) de la nitrocellulose. En effet, les valeurs les plus faibles ont été obtenues avec l'échantillon le moins humide. Une étude plus complète de la reproductibilité a été réalisée par 9 laboratoires issus de 8 pays différents en utilisant la même méthode (STANAG4178 Ed.2) de chromatographie d'exclusion stérique mais avec plusieurs modes de détection (viscosimètre, réfractomètre ou détecteur à diffusion de lumière). Ces analyses ont été réalisées sur des nitrocelluloses ayant des taux de nitration compris entre 11,6 et 13,5 %. Une faible reproductibilité a été obtenue entre les différents résultats, ce qui a été expliquée par une différence dans la méthode de séchage des nitrocelluloses avant analyse et par la difficulté d'intégrer les signaux obtenus.

Des échantillons de nitrocelluloses explosives et de nitrocelluloses utilisées dans la formulation des vernis ont été étudiés par SEC avec une triple détection [39]. L'analyse par SEC a permis de montrer une modification de la masse molaire moyenne en nombre mesurée, de la viscosité et de l'indice de réfraction des échantillons de nitrocellulose au cours du processus de dissolution. Ces paramètres sont alors constants après dissolution complète de la nitrocellulose. Des modifications apparentes de M_w ont également été observées en fonction de la concentration de la solution en nitrocellulose. Une diminution apparente de M_w est obtenue lorsque la concentration de la solution augmente. Ces résultats ont permis de montrer que M_w doit être obtenue en utilisant des solutions faiblement concentrées sauf pour les nitrocelluloses avec un M_w faible. Ce comportement a été justifié par une diminution du volume hydrodynamique du polymère lorsque la concentration de la solution augmente

conduisant alors à une diminution apparente de la valeur de M_w . Le temps nécessaire pour la dissolution de la nitrocellulose a également été étudié par mesure de l'indice de réfraction qui est directement proportionnel à M_w . Cette étude a permis de montrer que les nitrocelluloses les plus nitrées se dissolvent plus rapidement dans le THF (72 heures pour une nitrocellulose contenant 12,6 % d'azote et 168 heures pour une nitrocellulose ayant 11,8 % d'azote), le THF devant être un meilleur solvant pour les nitrocelluloses les plus nitrées.

Par ailleurs, l'effet des ultrasons sur la masse moléculaire a été mis en évidence grâce à des analyses par SEC [19]. L'étude a été réalisée sur deux types d'échantillons de nitrocellulose : des eaux usées contenant de la nitrocellulose et un étalon commercial de nitrocellulose ayant un taux de nitration < 12%. Ces deux types d'échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons à différentes fréquences (20, 360 et 660 Hz), à différentes températures et en utilisant différents solvants. Ces travaux ont permis de montrer que le principal effet des ultrasons conduit à la dépolymérisation de la nitrocellulose jusqu'à atteindre une valeur limite de M_w .

Une autre étude du comportement de la nitrocellulose en solution a été effectuée par Bellerby et coll. démontrant ainsi que sous agitation mécanique le temps nécessaire pour la dissolution diminue et que des valeurs de M_w plus faibles (diminution de 10 %) sont obtenues [40]. Ceci a été justifié par une possible cassure des chaînes polymères au cours de l'agitation mécanique. De même que dans les travaux effectués par Deacon et coll. [39], une influence du taux de nitration de la nitrocellulose sur le temps de dissolution a été constatée. Il a été supposé une possible formation de liaisons hydrogène entre les molécules de nitrocellulose qui serait plus importante pour les nitrocelluloses les moins nitrées conduisant ainsi à la formations de molécules de tailles plus importantes.

Des études du processus de dégradation de nitrocelluloses utilisées dans les formulations explosives ont également été réalisées par SEC pour comprendre le comportement de ce polymère. Ces travaux ont permis d'obtenir des informations indispensables concernant la sécurité lors de la production, du transport, du stockage et de la manipulation d'explosifs contenant de la nitrocellulose. Un traitement thermique de la nitrocellulose (ayant des taux de nitration compris entre 11,7 % et 12,2 %) extraite d'un explosif en poudre polymérisé (PBX) a été réalisé par Deacon et coll. pour étudier la dégradation du polymère [41]. L'analyse par SEC avec une triple détection a permis de mettre en évidence les changements de masse moléculaire, de viscosité intrinsèque et d'indice de réfraction au cours de la dégradation et d'étudier la cinétique du processus. Lors de l'étude de stabilité thermique, une diminution de M_w (de 875,1 à 122,4 kg/mol) et de la viscosité intrinsèque a été observée. Une autre étude de stabilité de la nitrocellulose (synthétisée à partir de pâte à bois et de coton) et extraite d'explosifs a été effectuée par MacDonald et coll. mettant en évidence la variation de la masse molaire

au cours du processus de traitement thermique [37]. Les résultats obtenus démontrent que plus les conditions de dégradation sont extrêmes (chauffage sur une durée plus importante, chauffage à haute température) plus la variation de masse M_w est importante. Des diminutions de viscosité semblables à celles obtenues par Deacon et coll. ont été constatées au cours du processus. Ces résultats sont cohérents avec l'idée de possible coupure aléatoire de la chaîne polymère pendant le chauffage.

5.1.2.2. Chromatographie de partage à polarité de phases inversée

Récemment (2013), l'utilisation de la chromatographie de partage à polarité de phases inversée a été brevetée par Combs et coll. pour déterminer le taux de nitration de nitrocelluloses ayant des taux de nitration compris entre 11,3 et 13,5 % [42]. La détermination du taux de nitration de la nitrocellulose est obtenue à partir de la valeur du temps de rétention de l'échantillon et ne nécessite pas au préalable de séchage de l'échantillon. L'étude a permis de montrer qu'il existait une corrélation linéaire entre le taux de nitration de la nitrocellulose et son temps de rétention. Cette méthode peut être mise en œuvre avec des colonnes monolithiques de silices greffées avec des groupements octadécyle (Onyx C18), des colonnes de silice sphérique greffées avec des groupements octadécyle (Microsorb MV-C18) ou des colonnes de silice sphérique greffées avec des groupements octyle (Microsorb MV C8). Les analyses ont été réalisées en mode gradient avec un mélange acétonitrile/eau, 1,2 diméthoxyéthane/eau ou acétone/eau avec un débit de phase mobile de 1,5 mL/min. La détection de la nitrocellulose a été réalisée par absorbance UV à 210 nm ou avec un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD). Aucune information n'est précisée concernant le choix de la phase mobile, de la phase stationnaire ou du mode de détection en fonction du taux de nitration de la nitrocellulose analysée. Les taux de nitration obtenus sont en accord avec ceux obtenus avec la méthode de dosage avec du sulfate de fer (MIL-STD-286C, méthode 209.11.1). Cette méthode permettrait également de caractériser la dispersion en taux de nitration d'un échantillon de nitrocellulose à partir de la symétrie du pic obtenu et de sa largeur à mi-hauteur.

Une autre étude par chromatographie de partage à polarité de phases inversée a été réalisée pour déterminer le taux de nitration de nitrocellulose à partir d'étalons de nitrocellulose ayant des taux de nitration (entre 10,9 et 13,53 %) et des masses molaires différents (entre 26 500 et 442 000 g/mol) [43]. Une colonne C18 non poreuse a été utilisée. La détection a été réalisée par ELSD. Dans ces travaux, les nitrocelluloses, insolubles dans l'eau et initialement solubilisées dans le THF, sont éluées en utilisant un gradient de phase mobile eau-THF, démarrant avec un fort pourcentage d'eau et en augmentant le pourcentage de THF. L'ordre de sortie des nitrocelluloses est fonction de leur solubilité dans l'éluant et donc dépend de leur taux de nitration. Dans ces conditions, les nitrocelluloses les plus

faiblement nitrées présentent des temps de rétention plus faibles que les nitrocelluloses hautement nitrées. La Figure I-II-11 représente le chromatogramme d'un mélange de trois nitrocelluloses étalons.

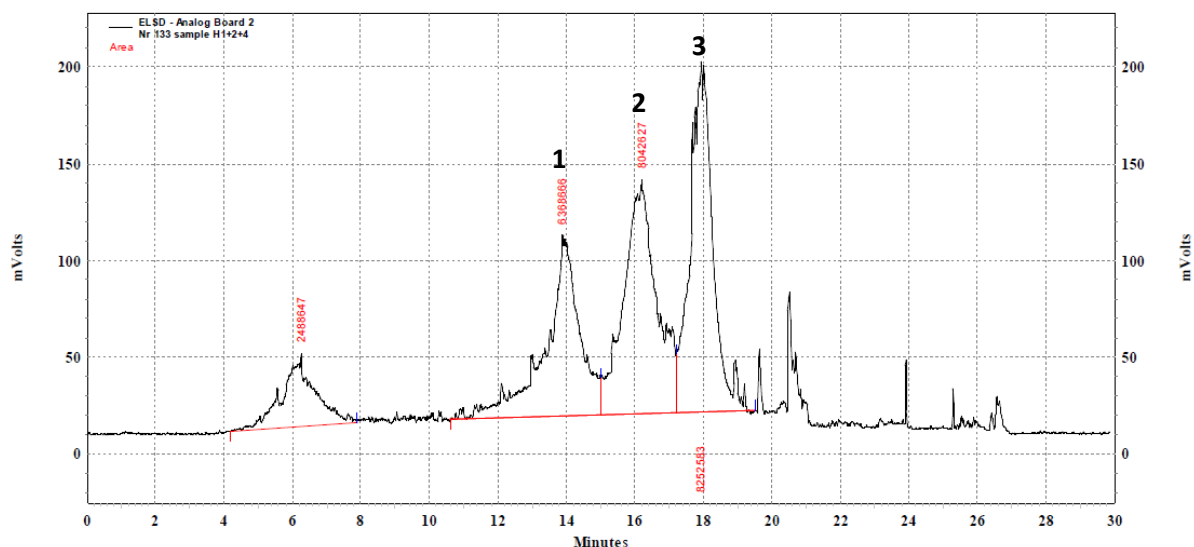


Figure I-II-11 : Chromatogramme d'un mélange standard de 3 nitrocelluloses étalons à 1 mg/mL dans le THF. Colonne : C18 silice non poreuse 33 cm × 4,6 mm di, diamètre de particules 1,5 μ m. Phase mobile : THF (A)/Eau (B) gradient d'élution : 50 % de A et de B pendant 10 min, de 50 % à 75 % de A en 4 min, de 75 % à 90 % de A en 13 min, de 90 % à 100 % de A en 1 min, 100 % de A pendant 5 min, 100 % de A à 50 % de A en 1 min puis 5 min avec 50 % de A et de B. Débit : 0,3 mL/min. Détection : ELSD. Volume injecté : 10 μ L. Identification: (1) NC avec un taux de nitration de 12,0 % et M_w = 246 000 g/mol (2) NC avec un taux de nitration de 12,7 % et M_w = 442 000 g/mol et (3) NC avec un taux de nitration de 13,5 % et M_w = 391 000 g/mol [43].

Les résultats obtenus démontrent une corrélation linéaire entre le taux de nitration de la NC et les temps de rétention confirmant les résultats obtenus par Combs et coll [42] (Figure I-II-12).

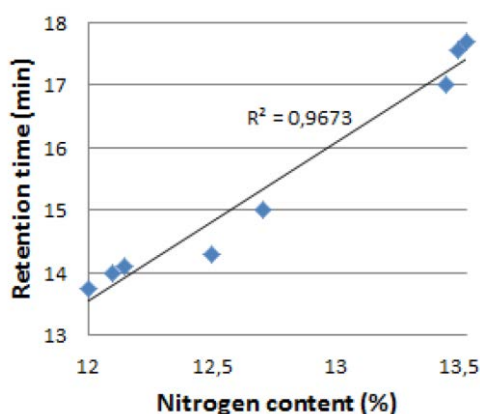


Figure I-II-12 : Graphe représentant l'évolution du temps de rétention en fonction du taux de nitration obtenu à partir des conditions d'analyse décrites en Figure I-II-11. D'après [43].

Au cours du temps, néanmoins, des problèmes de répétabilité sur les aires et la forme des pics ont été observés. Ils ont été expliqués par une précipitation partielle de la nitrocellulose dans la colonne, malgré l'utilisation d'une phase mobile constituée uniquement de THF en fin de gradient.

La chromatographie avec détection UV à 254 nm a été utilisée dans un premier temps pour le suivi de la dégradation de la nitrocellulose soumise à un processus de sonolyse par le biais de l'analyse des ions nitrite et nitrate formés [19]. En utilisant une colonne ABZ+ (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) et une phase mobile constitué d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (70/30 v/v) avec un débit de 1 mL/min, de façon non-surprenante, aucune séparation des 2 ions n'a été obtenue. Cette méthode a été remplacée par la suite par l'électrophorèse capillaire.

5.1.2.3. Chromatographie ionique

La chromatographie ionique a été utilisée pour l'analyse des ions nitrate et nitrite libérés lors de différents processus de dégradation de la nitrocellulose, soit à des fins de compréhension de ces processus, soit en vue de l'identification de la nitrocellulose dans des échantillons prélevés après attentat, soit pour la détermination du taux de nitration.

La cinétique de la réaction d'hydrolyse de la nitrocellulose (ayant un taux de nitration entre 12,2 et 13,5 %) en milieu alcalin a été étudiée par Christodoulatos et coll. à partir de la quantification par chromatographie ionique couplée à une détection par absorbance UV des ions nitrite et nitrate formés à l'issue de la réaction [28]. Su et coll. ont également utilisé la chromatographie ionique avec une détection UV lors de leur étude du procédé de dégradation de la nitrocellulose en milieu alcalin [29]. La chromatographie ionique avec détection conductimétrique avec suppression a également été utilisée par MacMillan et coll. pour analyser les ions nitrate et nitrite formés après l'hydrolyse alcaline du polymère [44]. La séparation des anions a été réalisée en utilisant une colonne Dionex AS14 Ionpak avec une phase mobile composée de 0,5 M de carbonate et 0,5 M de bicarbonate avec un débit de 1,8 mL/min. L'hydrolyse a été réalisée sur des échantillons de sable auxquels ont été rajouté de la nitrocellulose (avec un taux de nitration de 12 %) ainsi que sur des échantillons de sols réels contaminés par de la nitrocellulose. La préparation des échantillons a consisté en des étapes de lavage avec de l'eau et du méthanol pour éliminer les composés interférents, puis en une étape d'extraction de la nitrocellulose avec de l'acétone. Différentes bases (NaOH, Ca(OH)₂ et ammoniacque) pour effectuer l'hydrolyse et plusieurs acides (acide phosphorique, acide acétique, acide chlorhydrique et acide sulfurique) pour la neutralisation de l'échantillon après l'hydrolyse ont été testés. Les conditions optimales ont été obtenues en soumettant la nitrocellulose à une hydrolyse avec de la soude 5 M pendant 10 min puis en neutralisant l'hydrolysate avec un courant de CO₂. Ces conditions conduisent à l'obtention d'un rendement moyen de 91,6 %. L'hydrolysate est ensuite dilué avec de l'eau avant

analyse. Les concentrations de nitrocelluloses dans les échantillons réels ont été calculées à partir des concentrations en ions nitrite et nitrate (obtenues après l'analyse par chromatographie ionique de l'hydrolysate) et du taux de nitration de la nitrocellulose contenue dans l'échantillon de sable standard, ce qui est d'un intérêt pratique limité à la situation où l'on connaîtrait le taux de nitration de la nitrocellulose à l'origine de la pollution. La méthode utilisée a permis d'obtenir une limite de détection de 10 mg/kg de sol. Il a été étudié également l'influence de la distance entre le prélèvement et le lieu d'explosion sur la concentration en nitrocellulose des échantillons. Ainsi, les échantillons collectés dans un périmètre de 1 mètre autour du lieu d'explosion contiendraient une concentration en nitrocellulose plus faible que les échantillons prélevés à 15 m de l'explosion. Cependant, à 25 m du lieu d'explosion, aucune présence de nitrocellulose n'a été déterminée.

La chromatographie ionique a également permis la détermination du taux de nitration de la nitrocellulose (contenue dans des poudres propulsives) après une hydrolyse en milieu alcalin via l'analyse des ions nitrite et nitrate formés [45]. Dans un premier temps, un protocole d'isolement de la nitrocellulose a été utilisé pour éliminer les composés interférents (pouvant conduire à la formation de nitrites et nitrates après hydrolyse alcaline) présents dans les poudres propulsives [7]. Deux types de poudres propulsives, simple base et double base, ont été analysés. L'hydrolyse a également été effectuée sur des solutions commerciales de collodion. L'influence de la concentration et du volume de l'agent alcalin, de la température et de la durée d'hydrolyse sur les rendements obtenus a été étudiée. Les conditions optimales ont été obtenues en hydrolysant la nitrocellulose pendant 30 min à 150°C en présence d'une solution de NaOH à 10 g/L (0,25 M). La Figure I-II-13 montre les chromatogrammes d'un mélange standard d'ions nitrite et nitrate, et des hydrolysats de collodion et de nitrocellulose.

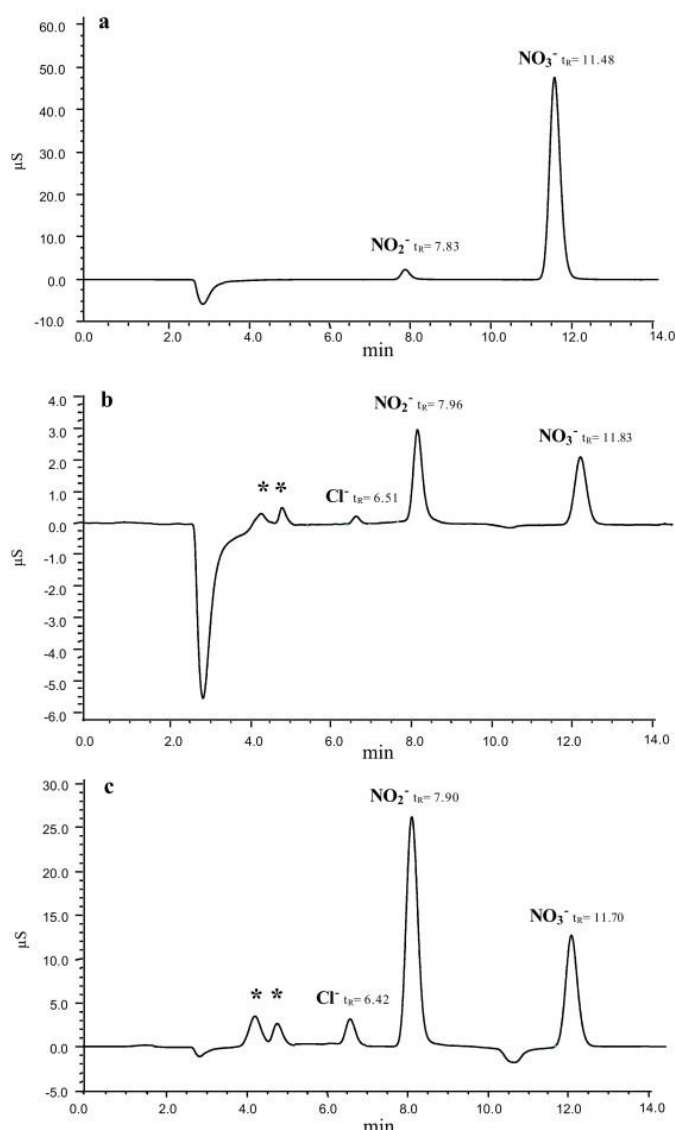


Figure I-II-13 : Chromatogrammes (a) d'une solution aqueuse standard contenant 0,35 mg/L d'ions nitrite et 0,75 mg/L d'ions nitrate ; (b) d'un hydrolysat de collodion et (c) d'un hydrolysat de nitrocellulose isolée d'une poudre propulsive. Phase stationnaire : colonne IonPac AS9-HC (250 mm × 4 mm di, diamètre des particules 9 μm). Colonne de garde : IonPac AG9-HC (50 mm × 4 mm di, diamètre des particules 9 μm). Phase mobile : Na₂CO₃ 9 mM, pH 11. Débit : 1mL/min. Volume injecté : 1 μL. Détection conductimétrique avec suppression. (*) : pics non identifiés. D'après [45].

Les écarts obtenus entre les taux de nitration attendus et les résultats expérimentaux sont compris entre 1 et 15 % pour les nitrocelluloses contenues dans les poudres propulsives. Ces écarts ont été expliqués par une possible dénitrification de la nitrocellulose au cours du temps car les hydrolyses ont été effectuées sur des échantillons de collodion et d'explosif de fabrication ancienne.

5.2. Electrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse capillaire, technique moins coûteuse que la chromatographie liquide et miniaturisée, a été utilisée comme technique alternative à la chromatographie ionique pour l'analyse des ions nitrite et nitrate libérés par sonolyse de la nitrocellulose. Plus récemment, cette technique a

été utilisée pour l'analyse de la nitrocellulose après dérivation et détection par fluorescence induite par laser.

L'électrophorèse capillaire a permis de mettre en évidence la dénitrification de la nitrocellulose qui se produit sous l'action des ultrasons par la quantification des ions nitrite et nitrate formés [19]. Un électrophorégramme type d'une solution de nitrocellulose soumise pendant 5 h aux ultrasons à 20 kHz est présenté en Figure I-II-14.

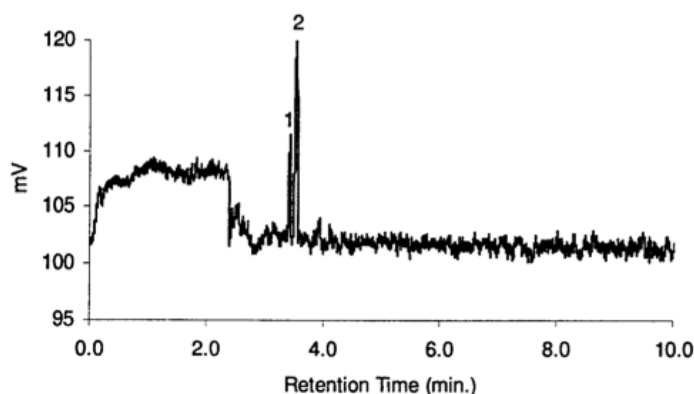


Figure I-II-14 : Electrophérogramme d'une solution de nitrocellulose à 200 mg/L dans l'eau après filtration et mise aux ultrasons (5 h, 20 kHz). Conditions d'analyse : capillaire : 75 μ m \times 60 cm (distance jusqu'à la détection non indiquée) ; électrolyte : phosphate de sodium 25 mM / hydroxyde de cetyltriméthylammonium 1 mM, pH 8 ; température : 25°C ; tension : -15 kV ; injection : hydrostatique (30 s) ; détection par absorbance UV à 185 nm. Identification : nitrite (1) et nitrate (2). D'après [19].

En 2012, García-Ruiz et coll. ont publié des travaux sur l'analyse de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire avec une détection par fluorescence induite par laser (CE-LIF) après dérivation avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) [46]. Cet agent de dérivation (couramment utilisé pour l'analyse des carbohydrates réducteurs) confère simultanément des charges négatives à l'extrémité de la chaîne cellulosique et un groupement fluorophore. Ces travaux ont été réalisés sur des nitrocelluloses faiblement nitrées (contenues dans des solutions commerciales de collodion) ainsi que sur des nitrocelluloses hautement nitrées ($12,75 < \% \text{ N} < 13,20 \%$) contenues dans les poudres propulsives. L'objectif de ces travaux était de différencier les nitrocelluloses selon leurs taux de nitration grâce aux profils électrophorétiques obtenus. Plusieurs conditions ont été testées pour la réaction de dérivation, en faisant varier la quantité initiale d'échantillon introduite (0,15 - 0,30 - 0,50 et 1,00 mg), le volume d'agent de dérivation (2 ou 4 μ L), le temps de réaction (4, 6 et 8 h) et la température de la réaction (55, 65 et 75°C). De même, différents paramètres (nature et concentration de l'électrolyte, température, tension de séparation et mode d'injection) ont été étudiées pour optimiser les conditions de séparation par électrophorèse capillaire. Le rendement de la réaction de dérivation augmente avec la température et la durée, mais diminuerait au-delà de 4 h. Parallèlement, néanmoins, l'APTS se dégrade. Globalement, le meilleur rapport signal sur bruit a été obtenu en

effectuant la réaction de dérivation à 65°C pendant 4 h. Les conditions d'analyse par CE donnant les meilleurs résultats en termes de nombre de signaux, d'intensité et de résolution ont été obtenus avec le tampon formiate de sodium 1,0 M à 25°C et avec une tension de séparation de -20 kV. Les électrophorégrammes obtenus dans ces conditions à partir d'une solution de collodion et d'une poudre propulsive sont présentés en Figure I-II-15. Aucune identification des signaux n'a été proposée.

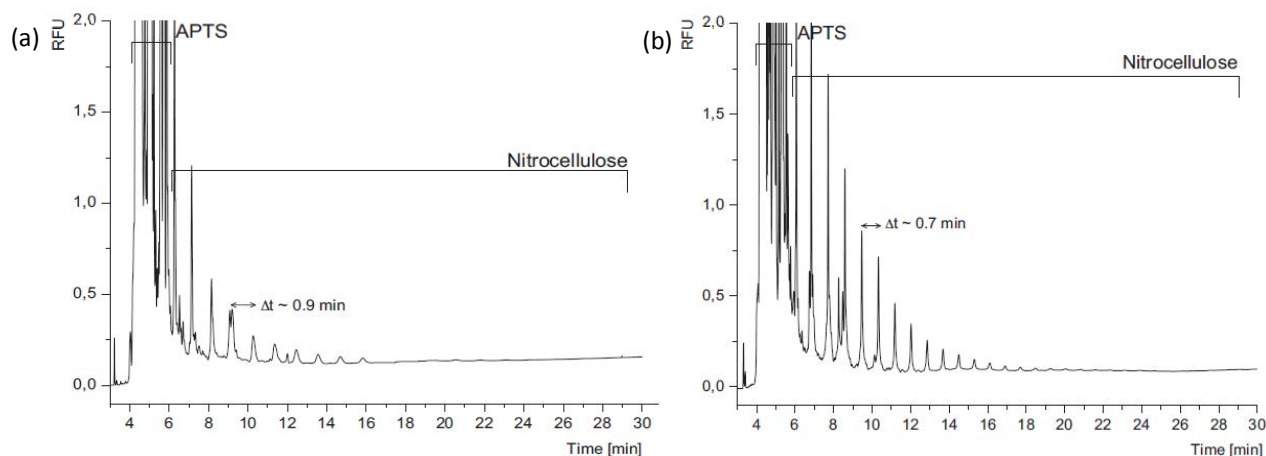


Figure I-II-15 : Electrophorégrammes de la nitrocellulose marquée à l'APTS contenue dans (a) une solution de collodion dans l'éther diéthylique (b) une poudre simple base. Conditions de dérivation : 0,30 mg de poudre, 2,0 μ L de solution d'APTS à 1×10^{-4} mg/mL dans une solution à 15 % (v/v) d'acide acétique glacial ; 2 μ L de solution de cyanoborohydrure de sodium à 1 M préparée dans le THF ; température : 65°C ; durée : 4 h. Conditions d'analyse CE : capillaire en silice vierge, 50 μ m di \times 50,2 cm (détection à 40 cm) ; tampon formiate de sodium 1,0 M, pH 2,0 (tel qu'indiqué dans la publication) ; tension appliquée -20 kV ; température : 25°C ; injection hydrodynamique : 35 mbars, 5 s ; détection LIF : $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, ($\lambda_{\text{em}} = 520$ nm. D'après [46].

Selon les auteurs, les profils obtenus permettraient de différencier les nitrocelluloses selon leur taux de nitration. En effet, La séparation par électrophorèse étant ici basée sur le rapport charge sur taille, c'est à dire sur le degré de polymérisation, une variation a été observée, selon le taux de nitration, pour l'écart de temps de migration entre les pics attribués à des celluloses différant d'un motif glucose : 0,9 min pour le collodion et 0,7 min pour la nitrocellulose explosive. Cette différence a été expliquée par les auteurs par une plus faible hétérogénéité chimique des nitrocelluloses faiblement nitrées, ce qui peut paraître discutable. Enfin, l'utilisation d'une technique de préconcentration électrocinétique par amplification du champ électrique a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode, rendant ainsi possible la détection de la nitrocellulose contenue dans un échantillon de poudre propulsive de 15 μ g seulement [46].

Plus récemment, des outils chimiométriques (analyse en composante principale (ACP) et modélisation indépendante des analogies de classes (SIMCA)) ont été utilisés pour discriminer les empreintes électrophorétiques obtenues après dérivation de nitrocelluloses explosives et nitrocelluloses non-explosives avec l'APTS et après analyse par CE-LIF [47]. Ces essais ont été menés en utilisant les profils

électrophorétiques obtenus à partir de 30 poudres propulsives et de 23 produits usuels contenant de la nitrocellulose (cigarettes, vernis à ongles, vernis...). L'influence de la présence de composés interférents (pouvant réagir avec l'APTS et donner une empreinte par CE-LIF), tels que des celluloses pouvant provenir du papier retrouvé sur une scène d'explosion, a également été évalué. De même que précédemment, aucune interprétation des électrophoregrammes obtenus n'a été proposée. Selon les auteurs, cette approche permettrait de différencier les nitrocelluloses explosives des nitrocelluloses non-explosives mais également des autres dérivés cellulosiques interférents (Figure I-II-16)

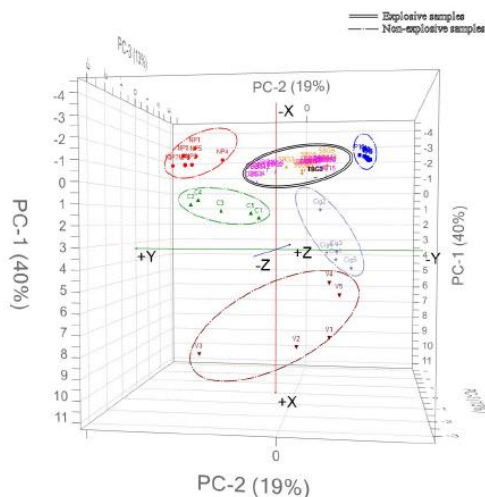


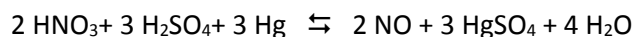
Figure I-II-16 : Sélection d'une vue 3D obtenue après l'analyse en composante principale (PCA) de données extraites d'analyses de différentes nitrocelluloses explosives et non-explosives par CE-LIF. D'après [47].

5.3. Autres méthodes de détermination du taux de nitration

Pour la détermination du taux de nitration de la nitrocellulose, d'autres méthodes que celles décrites précédemment existent.

La méthode de DEVARDA consiste à introduire un échantillon de nitrocellulose préalablement séchée dans un milieu contenant de la soude et de l'eau oxygénée concentrées. Dans ces conditions, un mélange d'ions nitrite et nitrate se forme par saponification des esters nitriques. Ces ions sont réduits par l'alliage de DEVARDA (contenant 45 % d'aluminium, 50 % de cuivre et 5 % de zinc) et forment de l'ammoniac. L'ammoniac est recueilli dans un volume connu d'acide sulfurique titré. L'excès d'acide sulfurique est ensuite dosé en retour par une solution titrée de soude [48].

La méthode de LUNGE est également utilisée pour déterminer le taux de nitration de la nitrocellulose. La nitrocellulose est mise en solution dans l'acide sulfurique en présence de mercure ce qui conduit à la libération d'acide nitrique, réduit ensuite en oxyde d'azote selon la réaction suivante :



Le volume d'oxyde d'azote libéré est mesuré par un nitromètre et permet de calculer le taux de nitration. Cette méthode est beaucoup moins précise que la méthode de DEVARDA citée précédemment et nécessite l'utilisation d'une grande quantité de mercure [49].

La détermination du taux de nitration de la nitrocellulose peut également être réalisée par la méthode de Schlösing-Schulze-Tiemann. Dans cette méthode, la nitrocellulose est chauffée en présence d'une solution de chlorure ferreux et d'acide chlorhydrique. Dans ces conditions, le nitrate est réduit en monoxyde d'azote dont la quantité est déterminée par volumétrie. La quantité de monoxyde d'azote libérée est proportionnelle au taux de nitration de la nitrocellulose et permet le calcul de cette grandeur [10].

Plus récemment, des méthodes de dosage potentiométrique en milieu non-aqueux ont été envisagées. Ces méthodes sont basées sur la réduction des groupements O-NO₂ par le trichlorure de titane ou par le sulfate ferreux. Dans cette dernière méthode, la nitrocellulose est estérifiée par une solution d'acide sulfurique concentré. L'acide nitrique libéré est ensuite réduit en monoxyde d'azote par une solution de sulfate ferreux. En présence d'un excès de monoxyde d'azote, il se forme le complexe Fe(NO)SO₄ de couleur caractéristique [50].

5.4. Techniques spectroscopiques

Des techniques d'analyses spectroscopiques telles que l'Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été utilisées pour étudier les phénomènes de fusion et décomposition thermique de nitrocelluloses de taux de nitration variés et confirmer que la décomposition intervient avant la fusion [20]. La FTIR a également été utilisée pour identifier et caractériser le produit obtenu après hydrolyse alcaline de la nitrocellulose [30]. L'analyse par FTIR a permis de montrer que le produit de dégradation correspond à de la cellulose par comparaison du spectre obtenu avec celui d'étalons. Les spectres FTIR obtenus sont présentés Figure I-II-17.

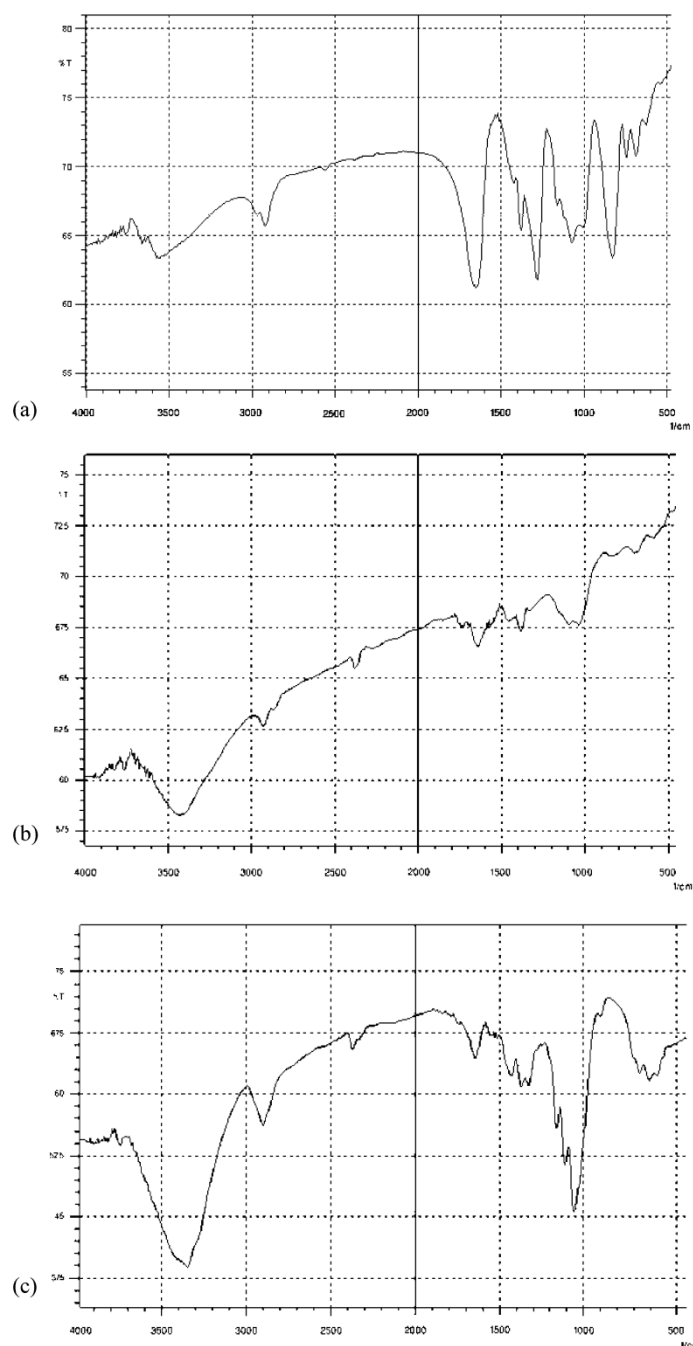


Figure I-II-17 : Spectres FTIR : (a) de nitrocellulose, taux de nitration 8,33%, (b) de résidu obtenu après hydrolyse basique de nitrocellulose à 55°C avec une solution d’hydroxyde de sodium à 1,5 M (durée de l’hydrolyse : non indiquée) et (c) de cellulose commerciale. D’après [30].

La FTIR a également été utilisée pour caractériser la nitrocellulose récupérée après extraction de formulations explosives de type simple base, double base ou triple base [7]. Les spectres FTIR des nitrocelluloses isolées contenues dans les trois types de poudres propulsives sont identiques. Ils ont ensuite été comparés à ceux de solutions de collodion contenant de la nitrocellulose faiblement nitrée. Cette comparaison a permis de mettre en évidence l’influence du taux de nitration de la nitrocellulose

sur le spectre FTIR obtenu (Figure I-II-18). En effet, la bande d'absorbance des groupements OH est visible sur le spectre FTIR du collodion, alors qu'elle ne l'est pas sur la poudre simple base.

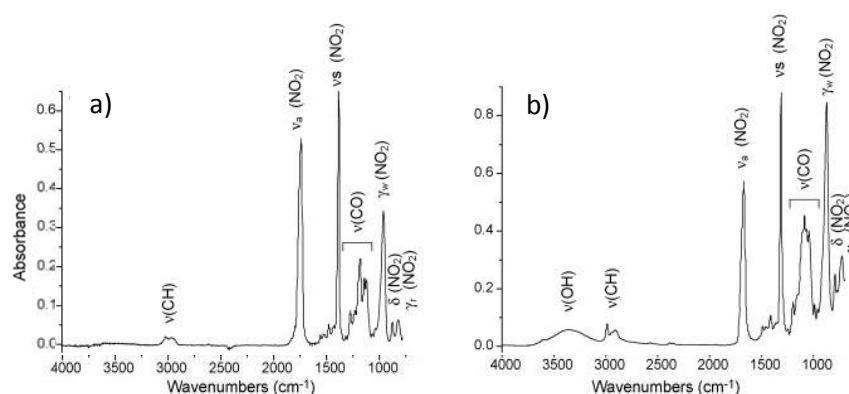


Figure I-II-18 : Spectres FTIR obtenus pour la nitrocellulose (a) isolée d'une poudre simple base et (b) contenue dans une solution de collodion dans le diéthyléther. D'après [7].

Récemment, la spectroscopie FTIR et la spectroscopie Raman ont été utilisées comme technique d'analyse pour différencier les poudres explosives de type simple base, double base et triple base [8]. De même, les spectres obtenus ont permis de différencier visuellement la poudre simple base contenant uniquement de la nitrocellulose de celle contenant également du dinitrotoluène. Une analyse discriminante a été appliquée aux spectres FTIR et Raman obtenus pour les poudres propulsives. L'analyse statistique a permis de montrer que la spectroscopie FTIR est plus discriminante que la spectroscopie Raman pour distinguer la poudre simple base sans dinitrotoluène, la poudre simple base et la poudre double base. Cependant, la spectroscopie Raman est plus discriminante que la spectroscopie FTIR pour différencier les poudres propulsives avec ou sans diphénylamine et dinitrotoluène. Ces travaux ont permis de montrer que ces deux types de spectroscopie combinés à une analyse discriminante sont un outil pour classer et identifier les différentes poudres explosives.

5.5. Techniques d'analyse thermique

Les techniques d'analyses thermogravimétriques (TGA), thermodifférentielles (DTA) et de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ont été très utilisées d'une manière générale pour étudier la stabilité thermique de la nitrocellulose. Les données de stabilités thermiques obtenues ont permis d'acquérir des connaissances indispensables concernant la manipulation, le stockage et l'utilisation des nitrocelluloses en toute sécurité.

La cinétique de la réaction de décomposition thermique de la nitrocellulose hautement nitrée (14,14 %) a été étudiée par Binke et coll. à partir d'analyses thermogravimétriques [24]. La première perte de masse observée (50 % de la masse initiale) a été décrite par une équation autocatalytique de

premier ordre. Les autres pertes de masse sont modélisées par deux autres modèles cinétiques différents.

La DSC et la DTA-TGA ont été utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques de la loi d'Arrhénius associée à la décomposition thermique de nitrocelluloses présentant différentes tailles de particules [25]. Ces techniques ont permis de comparer les stabilités thermiques de microfibrilles et nanofibrilles de nitrocelluloses.

La calorimétrie adiabatique à vitesse accélérée (Accelerating Rate Calorimetry) et la DTA-TGA couplée avec la spectrométrie de masse et l'infrarouge (FTIR) ont permis d'étudier la décomposition thermique de la nitrocellulose (taux d'azote : 13,15 %) dans des environnements particuliers (air, hélium et argon) [50]. L'analyse DTA-TGA couplée à l'infrarouge a permis d'identifier les gaz libérés lors de la décomposition thermique de la nitrocellulose. Les analyses par TGA effectuées en présence d'air et d'hélium démontrent l'indépendance entre la valeur de l'énergie d'activation de la réaction et la nature du gaz environnant. Les valeurs obtenues par TGA sont de 166 ± 2 kJ/mol (sous air) et 169 ± 6 kJ/mol (sous hélium) et confirment les valeurs déduites de l'analyse par DTA qui sont de 170 ± 4 kJ/mol (sous air) et 174 ± 2 kJ/mol (sous hélium). Cependant, les données obtenues à différentes températures par calorimétrie adiabatique à vitesse accélérée sont plus faibles (86 ± 4 kJ/mol sous argon et 122 ± 8 kJ/mol sous air) que celles obtenues par TGA et DTA. Ces analyses ont démontré une dépendance entre le gaz environnant et la valeur de l'énergie d'activation. Lin et coll. ont comparé les deux techniques analytiques TGA et DSC pour la détermination de l'énergie d'activation de la réaction correspondant à la dégradation thermique d'une nitrocellulose ayant un faible taux de nitration (11,71 %) [26]. L'analyse par DSC s'est avérée plus adaptée compte tenu du modèle mathématique utilisé. La DSC s'est également montrée appropriée pour mesurer et distinguer les énergies d'activation de nitrocelluloses (13,6 % de N) contenant différentes concentrations de diphénylamine (0 – 3 % m/m).

La calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC) a été utilisée aussi pour étudier les processus de fusion et de décomposition de la nitrocellulose [20].

La porosité de la nitrocellulose a été évaluée par thermoporosimétrie par Ksiazczak et coll. en utilisant la DSC [52]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence les propriétés hydrophobes de la nitrocellulose. Cette propriété, combinée à une tension superficielle élevée pour l'eau, rend difficile la pénétration de l'eau dans les pores et par conséquent limite l'étude de la nitrocellulose par thermoporosimétrie. La mise en suspension de la nitrocellulose en milieu aqueux sous agitation et à ébullition permet de faciliter la pénétration. Le rayon des pores de la nitrocellulose, déterminé à partir des analyses par DSC, est de $6,8 \pm 0,9$ nm pour la nitrocellulose ayant un taux de nitration de 12,4 %.

5.6. Spectrométrie de mobilité ionique (IMS)

La spectrométrie de mobilité ionique (IMS) est une technique robuste, peu coûteuse, sensible et portable pour l'analyse de composés organiques. Dans cette technique, les espèces ionisées sont soumises à un champ électrique dans un courant de gaz et seront séparées selon leur mobilité qui dépendra de leur masse, leur taille et leur forme. Elle est très utilisée pour la détection des substances explosives et des stupéfiants, notamment dans les aéroports.

En 2005, Miller et coll. ont développé une technique par IMS permettant l'analyse d'étalons de nitrocellulose et de nitrocelluloses contenues dans les poudres propulsives de type simple (nitrocellulose ≤ 98 % et 2,4-dinitrotoluène ≤ 8 %) et double base (nitrocellulose ≤ 95 % et nitroglycérine 4-40 %) [53]. La méthode employée pour le traitement de l'échantillon ainsi que pour l'analyse par IMS n'a pas été décrite par les auteurs car un dépôt de brevet était en cours. Les spectres IMS obtenus à partir d'un échantillon standard de nitrocellulose et à partir d'une poudre de type simple base sont présentés respectivement en Figure I-II-19 et en Figure I-II-20.

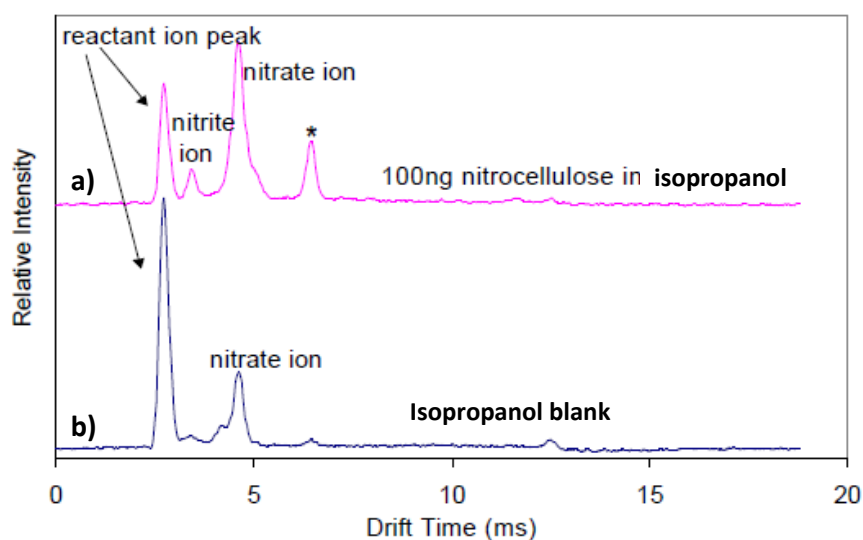


Figure I-II-19 : Spectres IMS obtenus à partir (a) d'un échantillon standard de nitrocellulose dissous dans l'isopropanol et (b) une solution d'isopropanol. Abréviation : (*) pic correspondant à la nitrocellulose. D'après C.J Miller et coll. [53].

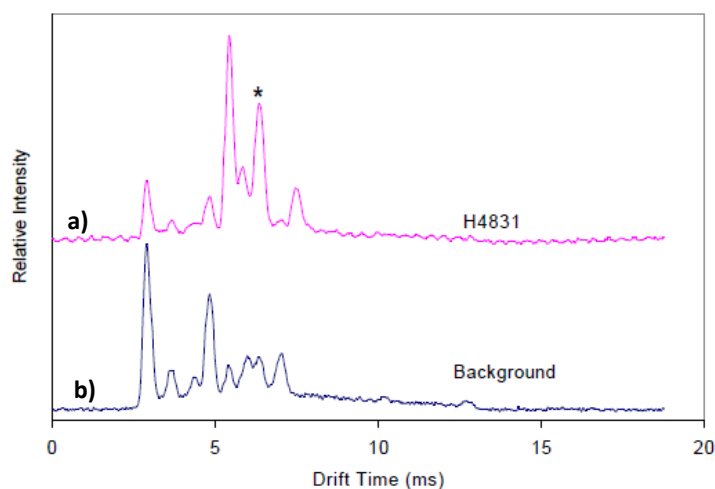


Figure I-II-20 : Spectre IMS obtenus à partir (a) d'une poudre de type simple base (H4831) et (b) du bruit de fond en utilisant une technique développée par C.J. Miller et coll. [53]. Abréviation : (*) pic correspondant à la nitrocellulose. Les conditions de préparation de l'échantillon et d'analyse par IMS ne sont pas indiquées par les auteurs.

L'analyse de l'échantillon contenant de la nitrocellulose révèle la présence d'ions nitrate non caractéristiques de la présence de nitrocellulose. Avec la nouvelle technique développée, la nitrocellulose apparaît sous la forme d'un signal à 6,3 ms sur le spectre IMS réalisé à partir de la solution standard et avec la poudre propulsive. Les ions nitrite et nitrate sont obtenus respectivement à 3,5 et 4,5 ms. Les autres signaux sur le spectre IMS de la poudre simple base peuvent être issus de la fragmentation du dinitrotoluène.

L'IMS a également été utilisée pour détecter en ligne, après concentration sur fibre SPME en polydiméthylsiloxane (PDMS), le 2-nitrotoluène (2-NT), 4-nitrotoluène (4-NT) et le 2,3-diméthyl-2,3-dinitrobutane (DMNB), préconisés comme marqueurs d'explosifs « plastiques » pour aider à leur détection, ainsi que le 2,4-dinitrotoluène (2,4-DNT), le 2,6-dinitrotoluène (2,6-DNT), le 2,4,6-trinitrotoluène (2,4,6-TNT), la nitrocellulose (NC), l'hexahydro-1,3,5-trinitro-s-triazine (RDX) et le tétranitrate de pentaérythritol (PETN) (Figure I-II-21) [54]. Cette technique très prometteuse est déjà assez largement utilisée pour identifier rapidement sur le terrain et de façon relativement peu onéreuse des composés volatils dans un espace de tête.

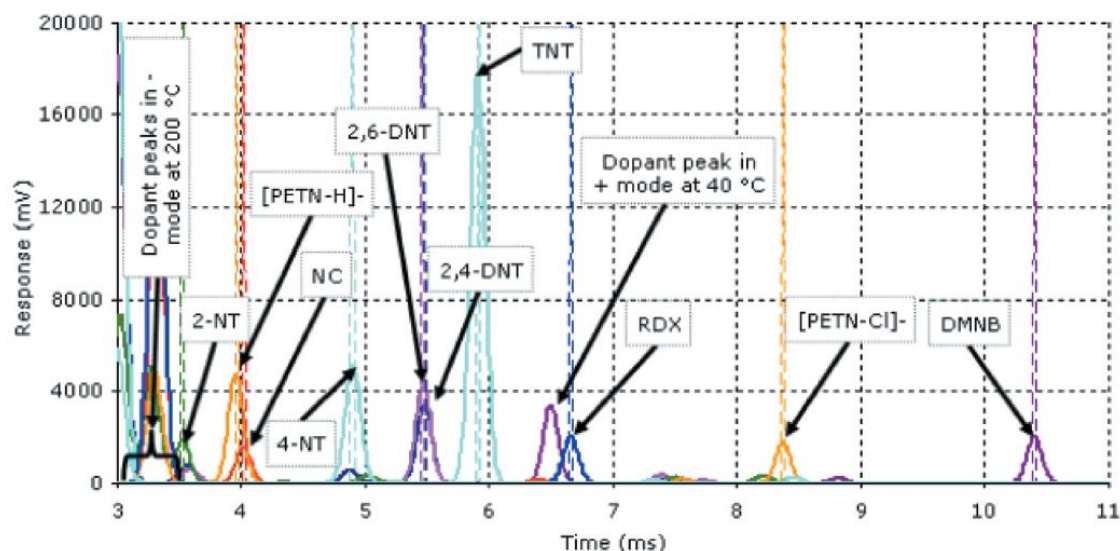


Figure I-II-21 : Spectres IMS (plasmagrammes) d'étalons de 2-nitrotoluène (2-NT), 4-nitrotoluène (4-NT), 2,3-diméthyl-2,3-dinitrobutane (DMNB), 2,4-dinitrotoluène (2,4-DNT), 2,6-dinitrotoluène (2,6-DNT), 2,4,6-trinitrotoluène (2,4,6-TNT), nitrocellulose (NC), hexahydro-1,3,5-trinitro-s-triazine (RDX) et tétranitrate de pentaérythritol (PETN), placés dans des tubes pour analyse d'espace de tête, extraits pendant 5 min à température ambiante par une fibre en polydiméthylsiloxane (PDMS), puis désorbés à 260 °C sous hélium à un débit de 1 L / min [54].

5.7. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse avec ionisation par désorption plasma (PD-MS) couplée à un analyseur à temps de vol (TOF) a été utilisée par Hakansson et coll. pour différencier la nitrocellulose d'autres produits énergétiques (PETN, TNT, RDX, cyclotétraméthylènetétranitramine (HMX), 2,4,6,8,10,12-hexanitrohexaazaisowurtzitane (CL-20)) [55]. Les échantillons ont été préparés simplement en déposant par électronebulisation sur une feuille d'aluminium Mylar 200 μ L d'une solution à 1 g/L dans l'acétone de chacun de ces produits. Les spectres de masse ont été enregistrés jusqu'à des rapports m/z de 100 en ionisations positive et négative. Les spectres de masse obtenus en ionisation positive sont présentés en Figure I-II-22.

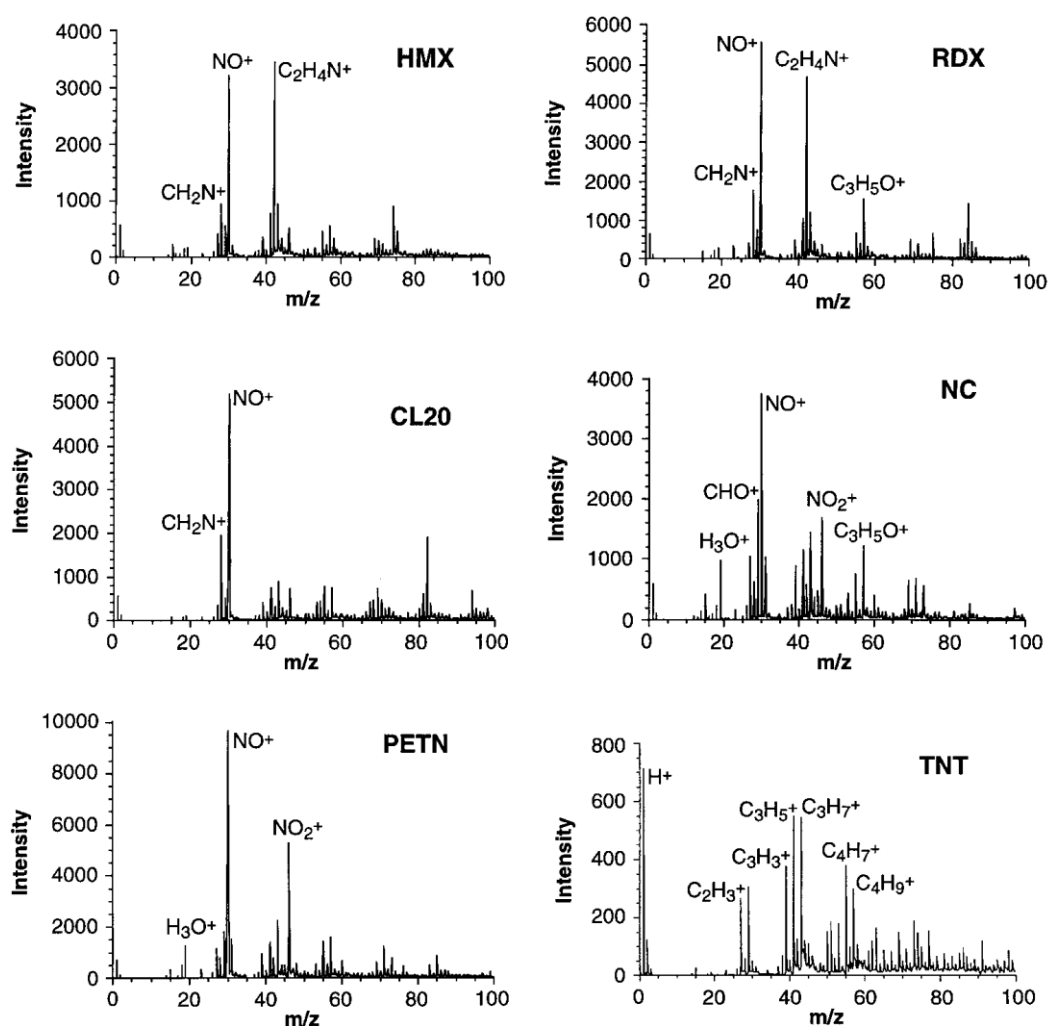


Figure I-II-22 : Spectres de masse obtenus en configuration désorption plasma-temps de vol pour différents explosifs en mode d'ionisation positive. HMX : cyclotétraméthylènetétranitramine ; RDX : hexahydro-1,3,5-trinitro-s-triazine ; CL20 : hexanitrohexaazaisowurtzitane ; NC : nitrocellulose ; PETN : pentaérythritol tétranitrate ; TNT : trinitrotoluène. Solutions à 1 g/L de chacun des composés dans l'acétone. L'identification des ions a été réalisée en comparant les valeurs expérimentales obtenues avec les valeurs théoriques des différentes combinaisons d'éléments possibles avec une précision de masse supérieure à 20 mDa. D'après [55].

En mode d'ionisation positive, toutes les substances analysées sauf le TNT forment un pic NO^+ très intense. A la différence des autres explosifs, les ions NO_2^+ et CHO^+ sont abondants pour la nitrocellulose, ce qui permet de mettre en évidence sa présence. En outre, l'ion $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+$ est absent, mais c'est aussi le cas pour le CL-20, le PETN et le TNT.

En mode d'ionisation négative (Figure I-II-23), les ions CN^- , CNO^- et NO_2^- sont présents dans HMX, RDX, CL20, et en plus faible proportion dans NC et PETN. Pour ces deux composés, l'ion nitrate NO_3^- est le plus abondant. Sa présence caractéristique a été expliquée par la structure chimique de ces deux composés. En effet, à la différence des autres, les groupements NO_2 dans la molécule sont liés à un oxygène. Pour les autres explosifs (sauf le TNT), les groupements NO_2 sont directement liés à des

atomes d'azote. Les ions restant sur le spectre de masse ont été attribués à des ions de faibles masses libérés lors de la réaction de fragmentation.

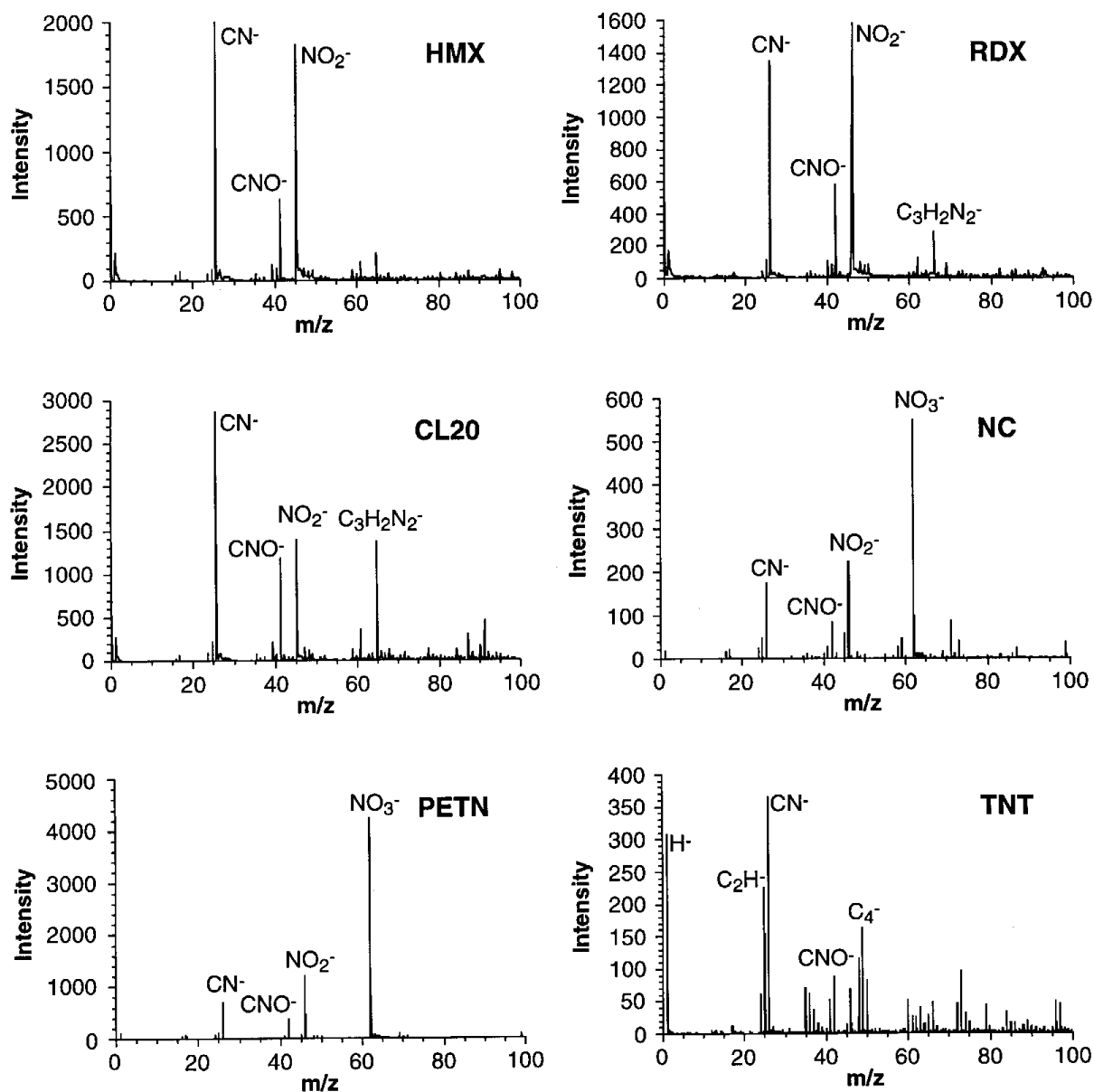


Figure I-II-23 : Spectres de masse obtenus en configuration désorption plasma-temps de vol pour les différents explosifs en mode d'ionisation négative. Abréviations : voir Figure I-II-22. Les identifications des ions ont été réalisées en comparant les valeurs expérimentales obtenues avec les valeurs théoriques des différentes combinaisons d'éléments possibles avec une précision de masse supérieure à 20 mDa. D'après [55].

La spectrométrie de masse des ions secondaires en temps de vol (TOF-SIMS) a été utilisée par Mahoney et coll. pour différencier 3 poudres propulsives sans fumée et 6 poudres noires explosives grâce à une analyse en composante principale (ACP) [56]. Parmi les 3 poudres sans fumée analysées, deux sont des poudres de type double base (contenant de la nitrocellulose et de la nitroglycérine) et une est de type simple base contenant uniquement de la nitrocellulose. Ces poudres contiennent de

nombreux additifs organiques notamment des stabilisants (éthylcentralite, diphénylamine...), des plastifiants (phtalates, triacétate de glycéryle), des inhibiteurs (dinitrotoluène, nitroguanidine) et des lubrifiants (graphite) qui permettront ici de les différencier. Quatre des poudres noires analysées sont constituées d'un mélange de KNO_3 (salpêtre), de sulfure et de charbon. Ensuite, les deux autres formulations de poudres noires analysées contiennent de l'acide ascorbique à la place du sulfure, du KClO_4 , de l'acide benzoïque et parfois du dicyanodiamide. Les spectres de masse pour chaque poudre propulsive ont été obtenus en utilisant un spectromètre de masse équipé d'une source d'ions primaires constitué de Ar^+ et de Ga^+ . Ce faisceau d'ions primaires vient bombarder la surface de l'échantillon avec un angle incident de 45° . Les spectres de masse obtenus pour chaque formulation explosive présentent des pics caractéristiques de la présence de nitrocellulose, de stabilisants organiques, de nitroglycérine et d'hydrocarbure. Les spectres de masse obtenus sont cohérents avec les compositions des poudres propulsives indiquées par le fabricant. Les ions obtenus diffèrent selon les additifs présents dans la formulation, ce qui a permis de distinguer les poudres propulsives, mais pas de façon complète. Une analyse en composante principale a été utilisée pour permettre la différenciation certaine des formulations explosives à partir des spectres de masse obtenus. En effet, la quantité de données générées ne permettait pas de le faire, par simple visualisation.

Enfin, la spectrométrie de masse de rapport isotopique (IRMS) (isotopes stables du carbone, hydrogène, oxygène, azote), couplée à un analyseur élémentaire ou à un pyrolyseur, est aussi couramment utilisée pour discriminer la source de différentes substances dans le domaine forensique. Elle a été en particulier appliquée aux explosifs nitrés (PETN, TNT, mélanges nitrate d'ammonium-gazole) pour discriminer leur fabrication [57]. La détermination simultanée de plusieurs rapports isotopiques permet d'augmenter la fiabilité de la discrimination. L'utilisation de ces techniques a également été évoquée dans le cas de la nitrocellulose [58], sans avoir été rapportée de manière détaillée, à notre connaissance. En effet, les rapports isotopiques du carbone et de l'azote pourraient respectivement donner accès à la source de cellulose et au procédé de nitration employé. Cependant ces techniques nécessitent l'établissement de bases de données conséquentes. Il est à noter que la mesure des rapports isotopiques de l'hydrogène par la technique de pyrolyse-GC-IRMS n'est pas pertinente dans le cas des composés organiques fortement nitrés (ratios N/H supérieurs à 1/5, ce qui est le cas de la nitrocellulose (ratio N/H = 1/2,33)), en raison d'une perte d'exactitude et de précision de la mesure liée à une séparation chromatographique incomplète du dihydrogène et du diazote et au phénomène de compétition d'ionisation qui en résulte dans la source de l'IRMS [59].

5.8. Extraction de la nitrocellulose

En 2010, pour la première fois, un protocole d'isolement de la nitrocellulose dans les poudres propulsives a été mis au point et publié par López- López et coll. grâce à un procédé d'extractions successives avec une phase aqueuse ou en présence de différents solvants organiques [7]. Ces extractions ont été réalisées sur des poudres propulsives de type simple base (contenant de la nitrocellulose ayant un taux de nitration de 13,0 %), double base (contenant des nitrocelluloses de taux de nitration 12,0 et 13,2 %) et triple base (contenant de la nitrocellulose ayant un taux de nitration inconnu). Pour les 3 types de poudres propulsives, le méthanol a été choisi comme premier solvant d'extraction, suivi ensuite par d'autres extractions avec le dichlorométhane, le méthanol et l'eau. Grâce à des analyses par HPLC-UV-MS des extraits obtenus à chaque étape, le nombre d'extractions nécessaires pour l'élimination des composés interférents a pu être déterminé. Les chromatogrammes obtenus pour les 3 types de poudres propulsives permettant le suivi des composés interférents éliminés dans les surnageants sont présentés Figure I-II-24. On constate que trois extractions successives initiales par le méthanol sont nécessaires pour éliminer complètement les additifs à la nitrocellulose.

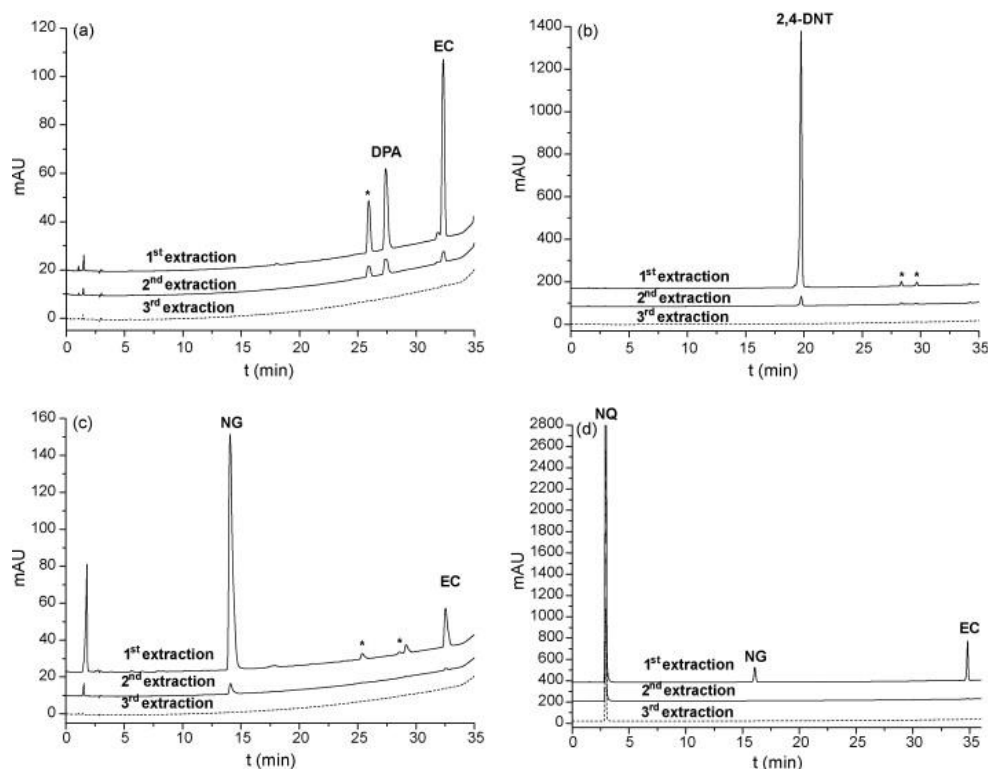


Figure I-II-24 : Chromatogrammes HPLC-UV d'extraits d'échantillons d'explosifs obtenus après une, deux ou trois extractions successives avec du méthanol pour une poudre de type simple base (a), deux poudres de type double base (b et c) et pour une poudre de type triple base (d). Le chromatogramme (b) a été obtenu à partir d'une poudre ne contenant pas de nitroglycérine et le chromatogramme (c) a été obtenu à partir d'une poudre ne contenant pas de dinitrotoluène. Les

extractions ont été réalisées à 45°C aux ultrasons pendant 10 min avec 3 mL de méthanol pour 0,03 g de poudre. Le surnageant obtenu a été centrifugé avant l'injection en HPLC-UV-MS. **Conditions d'analyse** : colonne ProntoSIL C18, 250 mm × 6 mm di, diamètres de particules, 5 µm ; phase mobile : A : eau ; B : méthanol ; gradient d'élution : de 25 à 40 % de B en 10 min, de 40 % à 55 % de B en 10 min, de 55 à 70 % de B en 10 min et de 70 à 95 % de B en 7,5 min ; débit : 1 mL/min ; température : 40°C ; détection DAD : 230 ± 2 nm avec référence à 550 ± 50 nm. Identification : DPA (diphénylamine), EC (éthylcentralite), NG (nitroglycérine), NQ (nitroguanidine), 2,4 DNT (2,4-dinitrotoluène) (*) pics non identifiés. D'après [7].

Le diagramme présenté Figure I-II-25 résume le protocole d'extraction mis au point en utilisant une quantité initiale de poudre de 0,03 g et indique les produits éliminés à chaque étape de l'extraction.

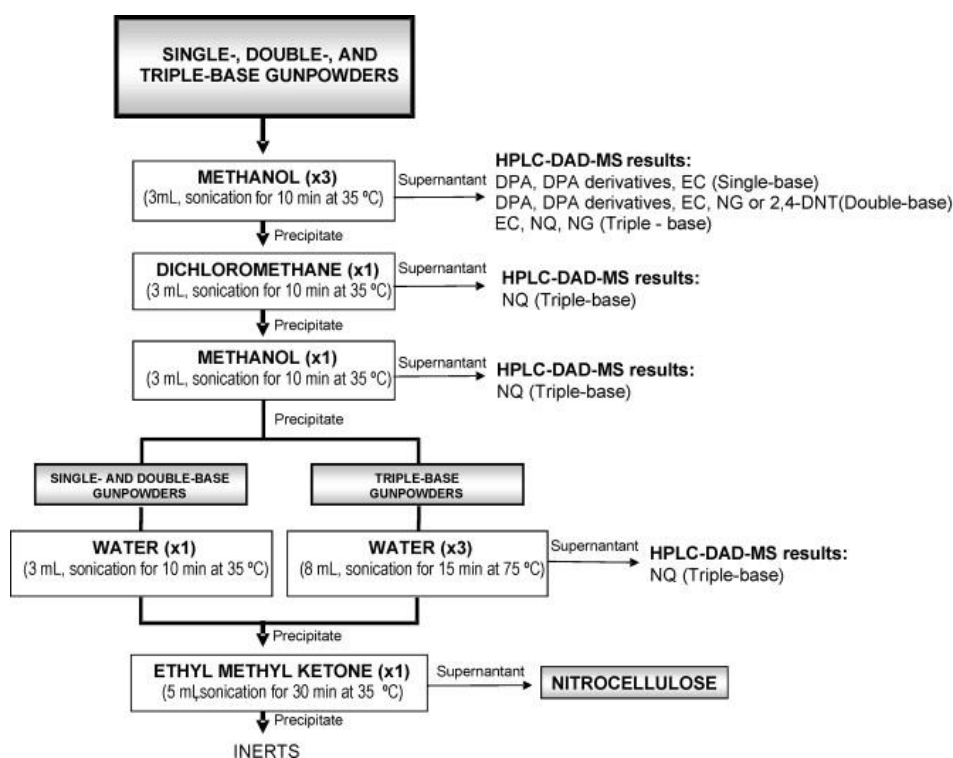


Figure I-II-25 : Protocole d'isolement de la nitrocellulose. Abréviations : DPA : diphénylamine ; EC : éthylcentralite ; NG : nitroglycerine ; NQ : nitroguanidine ; 2,4-DNT : 2,4-dinitrotoluène. D'après [7].

La nitrocellulose récupérée à l'issue de l'extraction a été caractérisée par FTIR. Les spectres FTIR des nitrocelluloses isolées contenues dans les trois types de poudres propulsives sont identiques (voir aussi § I-II-5.4).

Une interface couplant la micro-extraction en phase solide avec la spectrométrie de mobilité ionique (SPME-IMS) a été développée par Peer et coll. pour l'analyse de composés communément utilisés dans les explosifs, notamment la nitrocellulose contenue dans la poudre propulsive, les nitrotoluènes, dinitrotoluènes et trinitrotoluène, le 2,3-diméthyl-2,3-dinitrobutane (DMNB), l'hexahydro-1,3,5-trinitro-s-triazine (RDX) et le tétranitrate de pentaérythritol (PETN) [54]. Une fibre

en polydiméthylsiloxane (PDMS) a été utilisée comme support pour l'extraction des composés volatils libérés par les produits explosifs.

Références

- [1] M.A. Fernández de la Ossa, M.López-López, M.Torre, C.García-Ruiz, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1740.
- [2] C.W. Saunders, L.T. Taylor, *J. Energy. Mater.* 8 (1990) 149.
- [3] C.Selwitz, *Cellulose nitrate in conservation*, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, C.A, USA 1988.
- [4] R.Rasines, M.López, M.Torre, C.García, *Anal. Quím.* 4 (2009) 265.
- [5] J.K. Byung, H. Hsin-Neng, T. Fong-Jung, *Anaerobic Digestion and Acid Hydrolysis of Nitrocellulose* (1999) (téléchargé en août 2012 sur <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA369787>).
- [6] J. Akhavan, *The Chemistry of explosives, Introduction to propellants and pyrotechnics*, RSC, Paperbacks, Cambridge, 1998, p 143-157.
- [7] M. López-López, M.A. Fernández de la Ossa, J. Saiz Galindo, J.L. Ferrando, A. Vega, M. Torre, C. García-Ruiz, *Talanta* 81 (2010) 1742.
- [8] M. López-López, J.L. Ferrando, C. García-Ruiz, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 92.
- [9] E.V. Turngren, Y. P. Carignan, *JANNAF propulsion Meeting*, CPIA, Pub 370, vol. 2 (1983) 175.
- [10] Dow Wolf Cellulosics, *Nitrocellulose* (téléchargé en août 2012 sur http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_08a6/0901b803808a680d.pdf?filepath=/822-00007.pdf&fromPage=GetDoc).
- [11] A. Riley, D.L. Kaplan, A.M. Kaplan. *Stability of nitrocellulose to microbial degradation* (1984). Technical Report Natick/TR-85/004 (téléchargé en août 2012 sur <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA146986>).
- [12] D.L. Freedman, J.M. Cashwell, B.J. Kim, *Waste Manage.* 22 (2002) 283.
- [13] O.E. Petrova, N.B. Tarasova, M.N. Davydova, *Anaerobe* 8 (2002) 315.
- [14] N.B. Tarasova, O.E. Petrova, D.A. Faizullin, M.N. Davydova, *Anaerobe* 11 (2005) 312.
- [15] N.B. Tarasova, O.E. Petrova, M.N. Davydova, B.I. Khairutdinov, V.V. Klockhov, *Biochemistry* 69 (2004) 809.
- [16] N. Auer, J.N. Hedger, C.S. Evans, *Biodegradation* 16 (2005) 229.
- [17] N. Auer, R.G. Veness, C.S. Evans, *Land Contam. Reclam.* 7 (1999) 301.
- [18] S. Vyazovkin, I. Dranca, A. J.Lang, *Thermochim. Acta* 437 (2005) 75.
- [19] D. Crokek, B. Dankowski. *Sonolysis of Nitrocellulose Fines* (téléchargé en janvier 2012 sur <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA377921>).
- [20] N. Binke, L. Rong, C. Xianqi, W. Yuan, H. Rongzu, Y. Qingsen, *J. Therm. Anal. Calorim.* 58 (1999) 249.
- [21] K. Katoh, L. Le, M. Kumasaki, Y. Wada, M. Arai, M. Tamura, *Thermochim. Acta* 431 (2005) 161.
- [22] M.A. Fernández de la Ossa, M.López-López, M.Torre, M. Torre, C. García-Ruiz in : M.C. Wythers, *Advance in Materials Science Research, Volume 7, Nitrocellulose in propellants: characteristics and thermal properties*, Nova Science Publishers, (2012)
- [23] S.M. Pourmortazavi, S.G. Hosseini, M. Rahimi-Nasrabadi, S.S. Hajimirsadeghi, H. Momemian, *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 1141.
- [24] N. Binke, L. Rong, Y. Zhengquan, W. Yuan, Y. Pu, H. Rongzu, Y. Qingsen, *J. Therm. Anal. Calorim* 58 (1999) 403.
- [25] M.R. Sovizi, S.S. Hajimirsadeghi, B. Naderizadeh, *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 1134.
- [26] C.P. Lin, Y.M. Chang, J.P. Gupta, C.M. Shu, *Process Saf. Environ.* 88 (2010) 413.
- [27] R.K. Campbell, D.L. Freedman, B.J. Kim, *Environ. Eng. 1999 Proc. ASCE-CSCE Natl. Conf.* (1999) 246.
- [28] D.M. Crokek, P.A. Kemme, J.M. Day, J. Cochran, *US Army Corps of Engineers, ERDC/CERL TR-01-66*, oct. 2001.
- [29] C. Christodoulatos, T. Su, A. Koutsospyros, *Water Environ. Res.* 73 (2001) 185.

- [30] T. Su, C. Christodoulatos. Destruction of nitrocellulose using alkaline hydrolysis (téléchargé en janvier 2012 sur <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADP017728>).
- [31] M. Raeisi, G.D. Najafpour, Iranica Journal of Energy and Environment 2 (3) (2011) 221.
- [32] M.A. Fernández de la Ossa, M.Torre, C.García-Ruiz, Boletín de la Sociedad Española de Cromatografía Y Técnicas Afines. Volumen 32 Núm.1 (2011) (téléchargé en janvier 2012 sur <http://www.secyta.org/secyta/html/es/actividades/boletines.jsp?ano=2011>).
- [33] M.A. Fernández de la Ossa, M.Torre, C.García-Ruiz, in M.CWythers (Editor), Advances in Materials Science Research, Volume 7, Nitrocellulose in Propellants: Characteristics and Thermal Properties, Nova Science Publishers, New York, USA, 2011.
- [34] D.M. Cropek, P.A. Kemme, J.M. Day (2001). Pyrolytic Decomposition Studies of AA2, a Double-Base Propellant (téléchargé en août 2012 sur <http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a399586.pdf>).
- [35] D.M. Cropek, J.M. Day, P.A. Kemme (2001) Incineration By-Products of AA2, NC fines, and NG Slums (téléchargé en août 2012 sur <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA395160>).
- [36] G. Heinzmann, Int. Annu. Conf. ICT. 33rd. 2002, 58, 1.
- [37] A. F. MacDonald, Int. Annu. Conf. ICT.34th. 2003, 126, 1.
- [38] P.R. Deacon, A.F. MacDonald, P.P. Gill, N. Mai, M. Bohn, H. Pontius, Int. Annu. Conf. ICT. 39th. 2008,68,1.
- [39] P.R. Deacon, R.N. Garman, A.F. MacDonald, C.A. Baker, Int. Annu. Conf. ICT. 37th. 2006, 151, 1.
- [40] J.M. Bellerby, P.R. Deacon, P.P. Gill, Int. Annu. Conf. ICT. 37th. 2006, 71, 1.
- [41] P.R. Deacon, G.R.A. Kennedy, A.L. Lewis, A.F. MacDonald, Symp. Chem. Probl. Connected Stab. Explos. 12th. 2004, 195.
- [42] M.T. Combs, United States Patent WO2013006218A1.
- [43] P.V. Rooijen, Characterization of nitrocellulose by 2D-HPLC (2013) Bachelor thesis, University of Amsterdam (downloaded in December 2013 from www.science.uva.nl/onderwijs/.../f1544880797.pdf)
- [44] D.K. MacMillan, C.R. Majerus, R.D. Laubscher, J.P. Shannon, Talanta 74 (2008) 1026.
- [45] M. López-López, J.M. Ramiro Alegre, C. García-Ruiz, M. Torre, Anal. Chim. Acta 685 (2011) 196.
- [46] M.A. Fernández de la Ossa, M. Torre, C. García-Ruiz, Anal. Chim. Acta 745 (2012) 149.
- [47] M.A. Fernández de la Ossa, F. Orteja-Ojeda, C. García-Ruiz, J. Chromatogr. A 1302 (2013) 197.
- [48] GEMO FN-102-A-1 (1989).
- [49] J. Quinchon, Les poudres, propergols et explosifs, Tec & Doc, Paris (1982) 62.
- [50] FN-102-B-1 (1989).
- [51] R. Turcotte, B. Acheson, K. Armstrong, Q.S.M. Jones, D.E.G. Jones, M. Paquet, Proc. Int. Pyrotech. Semin.33rd. 2006, 351.
- [52] A. Ksiazczak, A. Radomski, T. Zielenkiewicz, J. Therm. Anal. Calorim. 74 (2003) 559.
- [53] C.J. Miller, R.G. Ewing. Detection of nitrocellulose and nitrocellulose based explosives using ion mobility spectrometry (2005) (téléchargé en août 2012 sur http://www.kist-europe.com/isims/pdf/4/2/Miller_2_IJIMS_4_2001_2.pdf).
- [54] J.M. Peer, K.G. Furton, J.R. Almirall, J. Sep. Sci. 28 (2005) 177.
- [55] K. Hakansson, R.V. Coorey, R.A. Zubarev, V.L. Talrose, P. Hakansson, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 337.
- [56] C.M. Mahoney, G. Gillen, A.J. Fahey, Forensic Sci. Int. 158 (2006) 39.
- [57] D. Widory, J.-J. Minet, M. Barbe-Leborgne, Science & Justice 49 (2009) 62.
- [58] P.R. Deacon, 6th Int. Nitrocellulose Symp., Rijswijk, The Netherlands, April 23-24, 2014.
- [59] W. Meier-Augenstein, H.F. Kemp, C.M. Lock, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 2011.

CHAPITRE III : Les carbohydrates

1. Introduction

L'électrophorèse capillaire a été utilisée pour analyser différents types de carbohydrates tels que les monosaccharides, les oligosaccharides, les polysaccharides, y compris ceux provenant de la catégorie des glycoconjugués tels que les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycanes. De nombreuses mises au point portant sur les méthodes de séparation et de détection des carbohydrates par CE ont été publiées [1-3]. Les différents modes de détection des carbohydrates ont été résumés dans les travaux publiés par Paulus et coll. [4]. Novotny et coll. ont publié une mise au point portant sur l'analyse des monosaccharides et des polysaccharides provenant de glycoprotéines en se focalisant sur leur détection par fluorescence induite par laser (LIF) [5]. De plus, des mises au point portant uniquement sur l'analyse des carbohydrates neutres [6] ou acides [7,8] par CE ont été publiées. L'analyse des glycoaminoglycanes, et plus particulièrement des oligosaccharides qui leurs sont associés, a connu un essor considérable ces dernières années. En effet, il a été démontré que les structures de ces oligosaccharides peuvent être à l'origine des fonctions physiologiques des protéoglycanes. Ces composés ont été spécialement étudiés par les glycobiologistes. Les différentes techniques mises en œuvre pour l'analyse des glycoprotéines, des glycopeptides et des oligosaccharides après dérivation sont rassemblées dans les travaux publiés par Honda et coll. [9].

Différentes méthodes ont été mises en œuvre pour analyser les carbohydrates par CE, c'est à dire associer un mode de séparation et un mode de détection compatibles. Pour mettre en œuvre ces méthodes, les propriétés inhérentes des carbohydrates ont été exploitées telles que :

- la présence ou l'absence d'un (plusieurs) groupement(s) fonctionnel (s) ionisé ou ionisable par simple action sur le pH de l'électrolyte, tels que des groupements sulfate ou carboxylate. Par défaut, certaines fonctions alcool des carbohydrates sont susceptibles d'apporter une charge négative à pH très élevé.
- leur capacité à se complexer *in situ* avec des ions borate ou des cations métalliques permettant de leur apporter une charge et par conséquent de les séparer sous l'application d'un champ électrique.
- leur réactivité liée à la présence d'une extrémité réductrice ou de groupements fonctionnels (acide carboxylique ou amine) pouvant réagir avec un agent de dérivation susceptible d'apporter une charge, et/ou absorbant dans l'UV ou fluorescent, ce qui permet d'apporter une sélectivité

supplémentaire à la méthode, liée à l'aptitude de la famille d'intérêt à réagir avec l'agent de dérivation choisi.

- l'oxydation électrochimique des carbohydrates à la surface d'une électrode métallique permettant de les détecter sélectivement.

2. Analyse des carbohydrates non dérivés par CE

2.1. Détection des carbohydrates non dérivés

2.1.1. Détection par absorbance UV directe

De nombreux carbohydrates ne présentent pas de fonctions absorbant dans l'UV ou le visible, comme par exemple une double liaison carbone-carbone, conjuguée ou non avec une fonction acide carboxylique. Certains d'entre eux présentent cependant une faible absorbance dans le bas UV en dessous de 200 nm. En effet, les oligosaccharides contenant des fonctions acétyle (par exemple, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine) ou acide sialique (tels que les glycanes) peuvent être détectés entre 185 et 200 nm [10-14]. La détection de composés dans le bas UV impose néanmoins de nombreuses restrictions pour le choix de l'électrolyte de séparation qui doit être composé à partir d'espèces hautement transparentes dans le bas UV.

Une nouvelle approche consistant à utiliser un électrolyte constitué de soude à 130 mM et d'un tampon phosphate à 36 mM (pH= 12,6) a été développé par Rovio et coll. [15,16]. Dans ces travaux, douze carbohydrates neutres (xylitol, mannitol, saccharose, fucose, cellobiose, galactose, glucose, rhamnose, mannose, arabinose, xylose et ribose) ont été séparés en moins de 35 min et détectés directement à 270 nm sous une forme supposée être celle d'ions énolate [15]. Les effets des concentrations en soude et en tampon phosphate dans l'électrolyte ont été étudiés. L'ajout d'un tampon phosphate dans l'électrolyte a permis d'améliorer la résolution et de diminuer le bruit de fond en augmentant la viscosité de l'électrolyte. Les limites de détection obtenues avec cette méthode sont respectivement de 0,01 mM et 0,05 mM pour le glucose et le fructose.

Plus récemment, cette approche a été revisitée par Sarazin et coll. et a permis de mettre en évidence la présence d'une réaction de photo-oxydation lors du passage des composés dans la fenêtre de détection, permettant leur détection directe à 270 nm [17]. Dans ces travaux, le mécanisme proposé par Rovio et coll. a été infirmé, car certaines espèces telles que le saccharose ne présentant pas de fonction carbonyle (et donc ne pouvant pas conduire à la formation d'ions énolate), ont été détectées, et le malonaldéhyde a été proposé comme intermédiaire absorbant. Les influences de

l'intensité de la lampe, de la nature du carbohydrate, de la composition de l'électrolyte et de son pH, du temps de séjour dans la fenêtre de détection et du diamètre du capillaire sur la détection ont été étudiées. Ce mode de détection a été appliqué à l'analyse de mélanges de carbohydrates pouvant être présents dans des résidus post-attentat [17-19]. P. Castignolles et coll. [20,21] ont caractérisé par RMN les produits finaux formés lors de cette réaction de photo-oxydation, montrant qu'il s'agirait de carboxylates, et que l'oxygène jouerait un rôle dans le mécanisme de cette réaction.

2.1.2. Détection par absorbance UV ou fluorescence indirecte

Des méthodes de détection indirecte ont également été envisagées pour l'analyse des carbohydrates ne présentant pas une structure chimique permettant de les détecter directement ou de les dériver [22,23]. D'une manière générale, pour mettre en œuvre ces méthodes de détection indirecte, il est nécessaire d'introduire dans l'électrolyte une espèce ionique présentant une absorbance ou une fluorescence. Lorsqu'une espèce ionique non détectée passe devant la fenêtre de détection, une diminution locale de la concentration de l'ion absorbant ou fluorescent se produit conduisant à une diminution de l'absorbance ou de la fluorescence et à l'apparition de signaux négatifs. Les détections indirectes par UV ou par fluorescence ont déjà été envisagées pour l'analyse des carbohydrates chargés par CE. Afin d'obtenir des limites de détection acceptables, l'ion fluorophore ou l'ion chromophore doit présenter un coefficient d'absorption molaire ou un rendement quantique important et des mobilités proches de celles des analytes.

2.2. Séparation des carbohydrates non dérivés

La stratégie à adopter va dépendre essentiellement du fait que les analytes carbohydrate sont naturellement chargés ou non. S'ils sont chargés par la présence de groupements fonctionnels ionisables, le signe de la charge du groupement fonctionnel détermine la polarité de la tension à appliquer, en relation avec le choix d'opérer, ou non, en présence d'un écoulement électroosmotique. Les mono- et oligosaccharides sont le plus souvent séparés par électrophorèse de zone selon leur rapport charge/taille. Si la charge est récurrente le long de la chaîne, la séparation des polysaccharides selon la taille est améliorée en présence d'une solution de polymère enchevêtrée. Enfin, la séparation de carbohydrates « neutres » non-dérivés par CE requiert l'utilisation d'un agent complexant dans l'électrolyte de séparation apportant une charge *in-situ*, comme par exemple les tampons borate [24], ou certains cations alcalino-terreux [25] ou de métaux de transition [26]. Alternativement, on peut opérer en milieu très basique (pH > 12,5) pour profiter de l'acidité relativement grande des fonctions alcool des carbohydrates, notamment de la fonction alcool portée par le carbone anomère et générer ainsi une charge négative. On peut alors opérer par électrophorèse de zone en mode co- [17-19] ou

contre-électroosmotique [15,16] et utiliser la détection par absorbance UV directe après photo-oxydation dans la fenêtre de détection, comme cela a été décrit au § I-III-2.1.1.

3. Analyse des carbohydrates après dérivation par CE

3.1. Détection des carbohydrates après dérivation

3.1.1. Les réactions de dérivation

La dérivation des carbohydrates avec un agent de dérivation contenant un groupement fluorophore ou chromophore permet de les détecter à des seuils de concentrations plus faibles que ceux obtenus sans dérivation. L'agent de dérivation ne doit pas être choisi seulement en fonction de la sensibilité de la méthode désirée mais également en fonction des changements structuraux (apport d'une charge, hydrophobie,...) nécessaires pour pouvoir les séparer par CE. Ainsi, l'agent de dérivation doit préférentiellement être chargé dans une large gamme de pH et peut présenter un caractère hydrophobe ce qui permet de réaliser des séparations en chromatographie électrocinétique micellaire des carbohydrates dérivés. Pour que l'étape de marquage apporte un réel avantage pour l'analyse des carbohydrates, la réaction de dérivation doit répondre à plusieurs critères :

- le rendement de la réaction de dérivation entre le carbohydrate et l'agent de dérivation doit être élevé,
- la réaction de dérivation doit conduire à la formation d'un seul produit pour chaque espèce de carbohydrate à analyser,
- la réaction de dérivation doit être la plus rapide que possible,
- le produit dérivé doit être suffisamment stable pour permettre l'analyse,
- les produits secondaires formés lors de la réaction ne doivent pas être détectés,
- les étapes de préparation de l'échantillon doivent être minimisées,
- aucun groupement initialement présent sur le carbohydrate (résidu d'acide sialique,...) autre que celui impliqué dans la réaction de dérivation ne doit être modifié lors de la réaction de dérivation.

Les réactions de dérivation des carbohydrates sont classées en 3 catégories [2] :

- les réactions de condensation des carbohydrates carboxylés avec un agent de dérivation aminé en présence de carbodiimide,

- les réactions de condensation catalysées par une base entre la fonction carbonyle portée par les carbohydrates réducteurs et les hydrogènes réactifs présents dans le 1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMP) ou le 1-(p-méthoxy)phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMPMP),

- les réactions d'amination réductrice (les plus utilisées). Parmi ces réactions il existe :

- les réactions d'amination réductrice des carbohydrates réducteurs avec des agents de dérivation aminés qui conduisent à la formation de 1-amino-1-déoxyalditols, qui réagissent ensuite avec le 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldéhyde (CBQCA) en présence de cyanure de potassium,

- les réactions d'amination réductrice des carbohydrates réducteurs avec des agents de dérivation aminés qui conduisent à la formation de 1-amino-1-déoxyalditols, qui réagissent ensuite avec le 5-carboxytétraméthylrhodamine succinimidyl ester (TRSE).

3.1.2. Les réactions d'amination réductrice

Les réactions d'amination réductrice conduisent à la formation d'une base de Schiff par condensation de la fonction aldéhyde du carbohydrate réducteur avec un groupement amine primaire porté par l'agent de dérivation. Cette réaction est ensuite suivie d'une étape de réduction de la glycamine formée généralement en présence de cyanoborohydrure de sodium conduisant à la formation d'un dérivé stable présentant une fonction amine secondaire (Figure I-III-I) [27]. Plus récemment, un nouveau réducteur moins toxique, le 2-picoline borane a été utilisé. La réaction a lieu en milieu acide pour favoriser l'ouverture du cycle du carbohydrate. Au cours de cette réaction, une molécule d'agent de dérivation réagit avec une fonction réductrice du carbohydrate (extrémité réductrice dans le cas d'un polysaccharide).

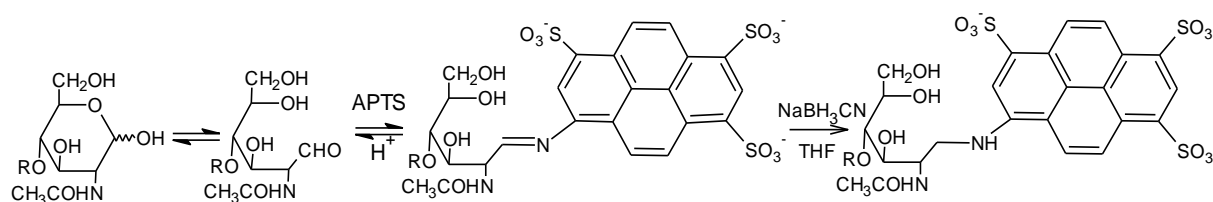


Figure I-III-I : Réaction de dérivation d'un oligosaccharide avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS). D'après [29].

Afin d'obtenir des rendements de dérivation élevés, un excès d'agent de dérivation doit être introduit. Il est également possible d'augmenter ces rendements en modifiant les conditions de la réaction telles que la durée de la réaction, la température, le pH et la nature du solvant. Les réactions d'amination réductrice sont généralement réalisées à des températures comprises entre 37 et 90°C

pendant des durées comprises entre 1h et une nuit en présence d'acide citrique ou d'acide acétique. Les solvants de dissolution de l'agent de dérivation les plus fréquemment utilisés sont le méthanol ou le DMSO. Ces différents paramètres doivent également être optimisés pour éviter toute dégradation du carbohydrate (fréquente pour les carbohydrates présentant des fonctions acide sialique) lors de l'étape de dérivation [30]. Ces réactions de dérivation ont lieu en milieu hydro-organique et nécessitent donc l'utilisation d'un agent de dérivation au moins faiblement soluble dans l'eau.

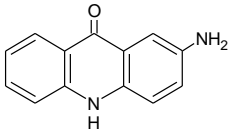
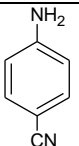
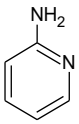
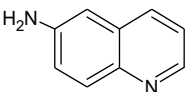
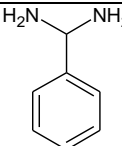
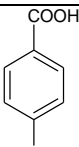
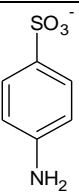
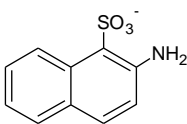
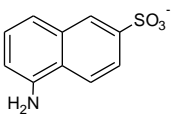
L'agent de dérivation utilisé doit présenter une très grande pureté. En effet, les impuretés comportant des fonctions amine pourront également réagir avec la fonction / l'extrémité réductrice du carbohydrate pour former des produits secondaires pouvant co-migrer avec les analytes d'intérêt [31]. L'excès d'agent de dérivation doit aussi être éliminé dans le cas où une détection par spectrométrie de masse est utilisée (pour éviter des phénomènes de suppression d'ions en source), tout particulièrement pour une analyse de traces. Pour cela, il est possible d'utiliser une extraction à l'aide de solvants organiques lorsque la différence d'hydrophobie entre l'analyte dérivé et l'agent de dérivation est suffisante et si la quantité d'échantillon le permet [32]. Dans le cas où l'échantillon contient une concentration en analyte élevée, une simple dilution de l'échantillon permet d'atténuer les effets de l'excès de réactif. Les carbohydrates dérivés peuvent être séparés de l'agent de dérivation par adsorption sur un filtre hydrophile en présence d'acétonitrile. Le carbohydrate dérivé est ensuite élué avec de l'eau, selon un mécanisme similaire au partage classique en chromatographie. Par ailleurs, les résines Sephadex contenant des fonctions aldéhyde réagissent avec l'excès de réactif et permettent son élimination [33]. La filtration sur gel avec des colonnes de type Sephadex G-10 et Biogel P-2 a également été envisagée pour éliminer l'excès d'agent de dérivation dans des échantillons d'oligo- / polysaccharides. [34,35].

Il a également été montré que la présence de sels dans l'échantillon, issus des étapes de préparation, entraîne des diminutions de rendement des réactions d'amination réductrice [36,37].

3.1.3. Les différents agents de dérivation

Il existe de nombreux agents de dérivation pouvant être utilisés pour l'analyse des carbohydrates par CE (Tableau I-III-I). Comme nous venons de le voir (§ 3.1.2), les réactifs aminés peuvent être condensés directement via la fonction aldéhyde réductrice du carbone anomère. Mais il est également possible d'utiliser des réactifs de dérivation d'amines primaires ou secondaires, après avoir réduit la fonction aldéhyde réductrice du carbohydrate en une fonction amine [38]. Naturellement, cette famille de réactifs peut être utilisée directement dans le cas des carbohydrates aminés. Enfin, la dérivation avec la 1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMP) résulte d'une réaction encore différente, la

condensation de la fonction hémiacétal de l'extrémité réductrice du carbohydrate avec le groupement méthylène actif du noyau pyrazolone. En fonction de leurs caractéristiques spectrales, ces agents de dérivation permettent de détecter les dérivés carbohydrates formés par spectroscopie UV et/ou fluorescence induite par laser. Le choix de l'agent de dérivation aura une influence sur la mobilité électrophorétique des dérivés, l'efficacité de la séparation et la sensibilité de la méthode.

Agent de dérivation	Formule chimique	Mode de détection	Référence
Réactifs aminés se condensant sur la fonction aldéhyde réductrice			
2-aminoacridone (2-AA)		LIF laser Ar $\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$	[39]
<i>p</i> -aminobenzonitrile (p-AB)		UV à 285 nm	[40]
2-aminopyridine (2-AP)		UV à 240 nm LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 375 \text{ nm}$	[41]
6-aminoquinoline (6-AQ)		UV à 270 nm LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 495 \text{ nm}$	[41,42]
S-(-)-1-phénéthylamine		UV à 200 nm	[43]
acide <i>p</i> -aminobenzoïque		UV à 285 nm	[44]
acide sulfanilique		UV à 247 nm	[45]
acide 2-aminonaphtalène-1-sulfonique (2-ANSA)		UV à 235 nm	[46]
acide 5-aminonaphtalène-2-sulfonique (5-ANSA)		UV à 235 nm LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$	[41]

acide 7-aminonaphtalène-1,3-disulfonique (ANDSA)		UV à 247 nm Lampe Xe-Hg $\lambda_{exc} = 315 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$	[45]
acide 4-amino-5-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique (AHNS)		LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$	[41]
acide 3-aminonaphtalène-2,7-disulfonique (3-ANDA)		UV à 235 nm	[46]
acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS)		LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$	[47,48]
acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS)		LIF laser Ar $\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$	[49-72]

Réactifs se condensant sur une fonction amine

3-(-4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldéhyde (CBQCA)		LIF laser Ar $\lambda_{exc} = 457 \text{ ou } 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 552 \text{ nm}$ LIF laser He-Cd $\lambda_{exc} = 442 \text{ nm}$	[73]
5-carboxytétraméthylrhodamine succinimidyl ester (TRSE)		LIF laser He-Ne $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$	[74]

Réactif à groupement méthylène se condensant sur la fonction hémiacétal

1-phényl-3-méthyl-5-pyrazolone (PMP)		UV à 245 nm	[75]
--------------------------------------	--	-------------	------

Tableau I-III-1 : Noms, abréviations et structure chimique des principaux agents de dérivation utilisés pour l'analyse des carbohydrates par CE.

En ne considérant que les carbohydrates neutres, l'utilisation du PMP en tant que marqueur conduit à la formation de dérivés qui deviennent chargés négativement en milieu basique du fait de la dissociation partielle du groupe hydroxyle énolique du marqueur. A cause de la faible ionisation des dérivés formés, il est nécessaire d'utiliser un électrolyte de séparation contenant des ions borate ou des micelles (micelles de dodécylsulfate de sodium) pour apporter de la sélectivité à la méthode. Les mêmes types d'électrolyte ont été utilisés pour séparer les dérivés neutres formés après dérivation des carbohydrates par la 2-AA ou le p-AB. La dérivation des sucres par la 2-AP, la 6-AQ et la S-(-)-1-phénéthylamine conduit à la formation de dérivés pouvant présenter une charge positive en milieu acide. Par ailleurs, l'utilisation de la S-(-)-1-phénéthylamine permet la séparation d'énantiomères. Après dérivation avec le CBQCA, les dérivés formés peuvent être chargés négativement en raison de l'ionisation du groupement carboxylique. Les dérivations réalisées avec le TRSE aboutissent à la formation de dérivés pouvant avoir une charge positive en milieu acide et pouvant devenir des zwitterions en milieu neutre et basique. L'acide *p*-aminobenzoïque est utilisé dans les réactions d'amination réductrice. Son utilisation conduit à la formation de dérivés chargés positivement à $\text{pH} < 3$ et chargés négativement pour des valeurs de $\text{pH} \geq 3,8$. L'acide sulfanilique, le 2-ANSA, le 5-ANSA, l'ANDSA, l'AHNS, le 3-ANDA, l'ANTS et l'APTS sont également des agents de dérivation utilisés dans les réactions d'amination réductrices. Les dérivés formés à partir de ces réactifs sont chargés négativement dans une large gamme de pH à cause de la présence des fonctions acide sulfonique et à la difficulté de protonation de la fonction amine ($\text{pK}_a \leq 3$).

3.1.4. Dérivation des carbohydrates par le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate

L'utilisation de l'APTS comme agent de dérivation a été proposé pour la première fois par Evangelista et coll. pour l'analyse de carbohydrates réducteurs, de fructose et de kétohexose [76]. Même si la structure chimique de l'APTS est proche de celle de l'ANTS, l'utilisation de l'APTS à la place de l'ANTS, du 5-ANSA, du p-AB et du 2-AP présente de nombreux avantages. Les dérivés carbohydrate-APTS présentent un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique plus importants. Les dérivés carbohydrate-APTS présentent un maximum d'absorption à 455 nm et une absorbance significative à 488 nm (Figure I-III-2). En ce qui concerne l'agent de dérivation seul, il présente un maximum d'absorption à 424 nm et une absorbance relativement faible à 488 nm.

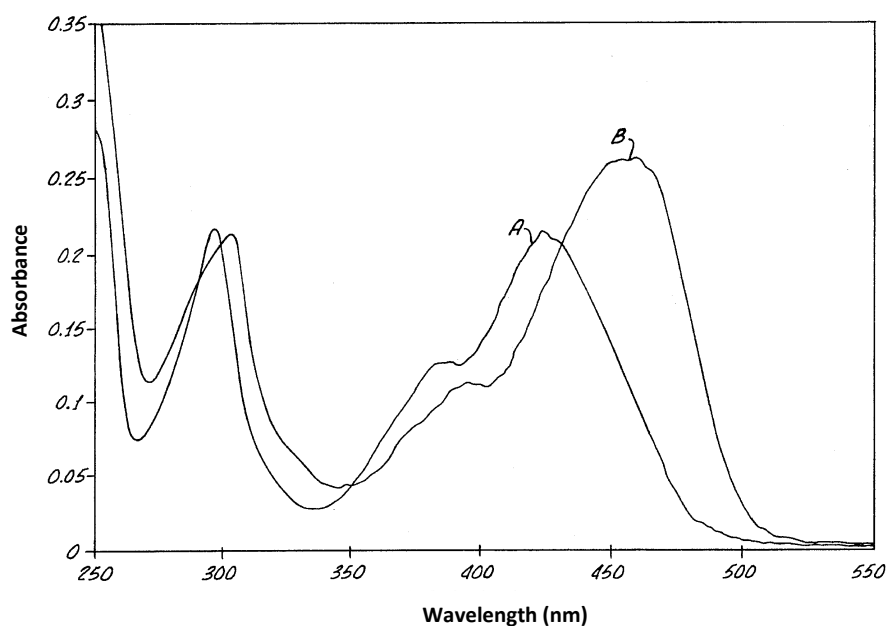


Figure I-III-2 : Spectres UV/Visible : (A) d'une solution d'APTS et (B) d'une solution d'un dérivé APTS-maltohexaose. Solutions de concentration 15 μ M préparées dans un tampon phosphate 50 mM à pH = 7. D'après [76].

Après excitation avec un laser à ions argon à 488 nm, les dérivés carbohydrate-APTS fluorescent avec une intensité ($\lambda_{\text{max em}} = 512$ nm) plus importante que l'agent de dérivation ($\lambda_{\text{max em}} = 501$ nm). L'utilisation d'un filtre passe-haut à 525 nm permet de détecter préférentiellement les dérivés carbohydrate-APTS. Dans ces conditions, les dérivés carbohydrates-APTS présentent une fluorescence 40 fois plus élevée que la fluorescence de l'APTS. L'utilisation de ce laser présente en outre des avantages par rapport au laser He/Cd ayant une longueur d'onde d'excitation de 325 nm. En effet, la durée d'utilisation du laser à ions Ar est plus élevée et celui-ci est moins sensible aux fluctuations de température extérieure. L'utilisation de ce type de laser permet enfin d'éviter la détection de composés endogènes interférents, présents dans les fluides biologiques et fluorescents après excitation avec un laser He/Cd.

L'influence de la nature et de la concentration de l'acide, de la quantité d'APTS et de la durée de la réaction sur les rendements de dérivation des monosaccharides (glucose et N-acétylglucosamine) a été particulièrement étudiée par Evangelista et coll. [77]. Pour cela, sept acides organiques (acide acétique, succinique, glycolique, L-malique, citrique, malonique et maléique) ayant des valeurs de pK_a comprises entre 1,91 et 4,75 à 25°C ont été testés. Les meilleurs rendements ont été obtenus en utilisant comme catalyseur l'acide citrique ($pK_a = 3,1$) à une concentration de 0,6 M. Les effets de la durée de la réaction et de la nature de l'acide utilisé sur les rendements de dérivation obtenus sont présentés en Figure I-III-3.

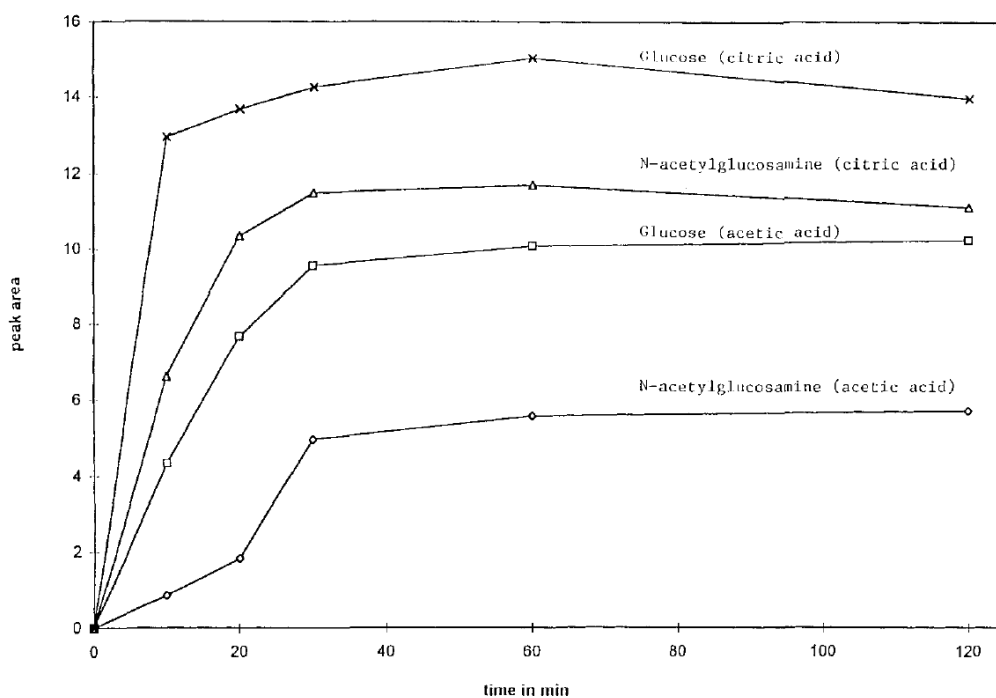


Figure I-III-3 : Evolution des rendements de dérivation obtenus après dérivation du glucose (Glc) et de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) par l'APTS en fonction de la durée de la réaction pour des milieux contenant de l'acide citrique ou de l'acide acétique. Conditions de dérivation : 5 nmol de Glc et de GlcNAc sont dérivés en présence de 200 nmol d'APTS et 2 μ mol de NaBH_3CN dans un volume total de 3 μ L contenant de l'acide citrique 0,6 M ou de l'acide acétique 0,6 M. Conditions d'analyse CE : capillaire en silice vierge, 19 $\mu\text{m} \times 27$ cm (détection à 20 cm) ; électrolyte : tampon borate 120 mM à pH = 10,2 ; température : 75 °C ; tension : -30 kV ; injection : 35 mbars pendant 20 s ; détection : LIF ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm). D'après [77].

La quantité de dérivés APTS formés se stabilise après 60 min de réaction à 75°C. Pour une durée de réaction donnée, la quantité de dérivés formés est environ deux fois plus importante quel que soit le carbohydrate lorsque l'acide citrique est utilisé à la place de l'acide acétique. En présence d'acide acétique, la quantité de dérivés formés n'atteint jamais la quantité formée en présence d'acide citrique. Cette différence a été expliquée par la possibilité en milieu acide acétique de consommer une partie du carbohydrate initialement présent pour former un produit secondaire qui n'est pas détecté. En effet, la fonction carbonyle réductrice peut être réduite en fonction alcool. La cinétique de la réaction d'amination réductrice est plus favorable en milieu acide citrique permettant de diminuer la compétition entre les deux réactions. Le Tableau I-III-2 rassemble les différentes conditions trouvées dans la littérature pour la dérivation de divers carbohydrates par l'APTS.

Analytes	Acide	Réducteur	$\frac{n_{\text{réducteur}}}{n_{\text{APTS}}}$	$\frac{n_{\text{APTS}}}{n_{\text{carbohydrate}}}$	Conditions de chauffage	Réf.
Glycoprotéines	Acide acétique à 15 %	NaBH_3CN 1 M dans le THF	5	-	55°C, 2 h	[49]

Maltooligosaccharides, glycanes linéaires et ramifiés sialylés, glycoprotéines	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	5	80	55°C, 2 h	[50]
Monosaccharides issus de glycoprotéines ou d'oligosaccharides après hydrolyse acide	Acide citrique à 25 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	5	-	55°C, 1h30	[51]
N-glycanes issus du virus de la grippe	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	50	-	37°C, 18 h	[52]
Monosaccharides	Acide citrique 600 mM	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	33	12	75°C, 1 h	[53]
Monosaccharides, disaccharides et oligosaccharides	Acide acétique 4,2 M	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	20	20	75°C, 1 h	[54]
Malto-oligosaccharides issus de la digestion par isoamylase du glycogène, de l'amidon de blé et de l'amidon de pomme de terre	Acide acétique glacial à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans l'eau	5	200	37°C, 15 h	[55]
Oligosaccharides et glycanes issus de glycoprotéines par digestion enzymatique	Acide citrique 1,2 M	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	50	10	55°C, 50 min	[56]
Oligosaccharides, glycanes sialylés et non sialylés issus de glycoprotéines par digestion enzymatique	Acide citrique 1 M ou acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	10	100	80°C, 1 h	[57]
Glycanes sialylés issus de glycoprotéines et oligosaccharides par digestion enzymatique	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	5	-	37°C, 1 nuit	[58]
Glycanes issus de glycoprotéines par digestion enzymatique	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	17,5	-	55°C, 2 h	[59]
Oligosaccharides issus de glycoprotéines par digestion enzymatique	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	262	-	80°C, 1 h	[60]

Monosaccharides et oligosaccharides	Acide citrique à 600 mM	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	33	12	75°C, 1 h	[61]
Monosaccharides et oligosaccharides	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	5	>8	60°C, 1 h30	[62]
Oligosaccharides	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	25	-	37°C, 1 nuit	[63]
Hydrolysats acide ou enzymatique de dérivés de cellulose	Acide acétique à 10 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	-	-	60°C, 2h	[64]
Oligosaccharides obtenus après digestion enzymatique de polysaccharides	Acide acétique glacial à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	25	-	37°C, 16 h	[65]
Oligosaccharides issus de glycoprotéines par digestion enzymatique	Différents acides testés	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	10	10	37°C, 16 h	[66]
Glycans libérés de glycopeptides de plantes par digestion enzymatique	Acide citrique à 1,2 M	NaBH ₃ CN 1 M dans le DMSO	50	-	37°C, 1 nuit	[67]
Glycans libérés d'IgG par digestion enzymatique	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	17,5	-	55°C, 2 h	[68]
Monosaccharides et oligosaccharides	Acide acétique à 25 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	50	0,2	75°C, 1 h	[69]
Oligosaccharides obtenus après digestion des glycoformes de l'AGP	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	20	-	55°C, 1 h 30	[70]
Monosaccharides, polysaccharides et maltooligosaccharides	Acide acétique à 15 %	NaBH ₃ CN 1 M dans le THF	25	-	55°C, 1 h 30	[71]

Tableau I-III-2 : Conditions utilisées dans la littérature pour la dérivation de divers carbohydrates par l'APTS. $\frac{n_{\text{réducteur}}}{n_{\text{APTS}}}$: rapport molaire réducteur/APTS. $\frac{n_{\text{APTS}}}{n_{\text{carbohydrate}}}$: rapport molaire APTS/carbohydrate.

3.2. Séparation des carbohydrates dérivés

En général dans ce cas, c'est l'électrophorèse capillaire de zone en milieu libre qui est utilisée, car les carbohydrates dérivés sont séparables en fonction de leur rapport charge/taille. Les conditions sont choisies selon les fonctions ionisables de l'agent de dérivation et la polarité de leur charge, qui dicte

d'une part le choix du pH du tampon de séparation, d'autre part de la polarité de la tension appliquée à l'entrée du capillaire de séparation. Cette dernière dépend aussi du choix d'opérer en présence d'un écoulement électroosmotique ou non, et dans le cas où il est conservé, de l'amplitude de celui ci par rapport à la migration électrophorétique (mode co-électroosmotique ou mode contre-électroosmotique). En raison de la présence de leurs 3 fonctions sulfonate ionisées dans toute la gamme de pH, les dérivés APTS peuvent être séparés même dans des électrolytes faiblement acides, le plus souvent en mode contre-électroosmotique, ce qui en fait l'intérêt.

Références

- [1] S. Suzuki, S. Honda, *Electrophoresis* 19 (1998) 2539.
- [2] Z. El Rassi, Y. Mechref, *Electrophoresis* 17 (1996) 275.
- [3] P.Oefner, C. Chiesa, G. Bonn, C. Horváth, J. Capil. *Electrophor.* 1 (1994) 5.
- [4] A. Paulus, A. Klockow, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 353.
- [5] M.V. Novotny, J. Sudor, *Electrophoresis* 14 (1993) 373.
- [6] R.J. Linhardt, A. Perrin, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 323.
- [7] S. Honda, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 337.
- [8] J. Crimshaw, *Electrophoresis* 18 (1997) 2408.
- [9] K. Kakehi, S. Honda, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 377.
- [10] M. Taverna, A. Baillet, D. Baylocq-Ferrier, *Chromatographia* 37 (1993) 415.
- [11] M. Taverna, A. Baillet, M. Schluter, D. Baylocq-Ferrier, *Biomed. Chromatogr.* 9 (1995) 59.
- [12] P. Hermentin, R. Doenges, R. Witzel, C.H. Hokke, J.F.G. Vliegenthart, J.P. Kamerling, H.S. Conradt, M. Nimtz, D. Brazel, *Anal. Biochem.* 221 (1994) 29.
- [13] K. Kakehi, A. Susami, A. Taga, S. Suzuki, S. Honda, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 209.
- [14] D.E. Hugues, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 315.
- [15] S. Rovio, Y. Kauhalusma, H. Simolin, *Electrophoresis* 28 (2007) 3129.
- [16] S. Rovio, H. Simolin, K. Koljonen, H. Sirén, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 139.
- [17] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, J-M. Mallet, P. Gareil, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7381.
- [18] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, *Talanta* 103 (2013) 301.
- [19] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, *Talanta* 99 (2012) 202.
- [20] J.D. Oliver, M. Gaborieau, E.F. Hilder, P. Castignolles, *J. Chromatogr. A* 1291 (2013) 179.
- [21] J.D. Oliver, A.A. Rosser, C.M. Fellows, Y. Guillaneuf, J.L. Clement, M. Gaborieau, P. Castignolles *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 1283.
- [22] E.S. Yeung, W.G. Kukr, *Anal. Chem* 63 (1991) 275.
- [23] E.S. Yeung, *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 125.
- [24] A.M. Arentoft, S. Michaelsen, H. Sorensen, *J. Chromatogr. A* 652 (1993) 517.
- [25] Z. El Rassi, *Adv. Chromatogr.* 34 (1994) 177.
- [26] Z.El. Rassi, W. Nashabeh, in: Z. El Rassi (Ed), *carbohydrate analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. Lib. vol. 58, Elsevier, Amsterdam 1995, p 607.
- [27] F.N. Lamari, R. Kuhr, N.K. Karamanos, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 15.
- [28] L.R. Ruhaak, E. Steenvoorden, C.A. Koeleman, A.M. Deelder, M. Wuhrer, *Proteomics* 10 (2010) 2330.
- [29] P. Thibault, S. Honda, *Capillary electrophoresis of carbohydrates*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, 2003, p 115.
- [30] P. Pfaff, F. Weide, R. Kuhr, *Chromatographia*, 49 (1999) 666.
- [31] F.-T.A. Chen, R.A. Evangelista, *Electrophoresis* 19 (1998) 2129.
- [32] N.T. Tran, M. Taverna, F.S. Deschamps, P. Morin, D. Ferrier, *Electrophoresis* 19 (1998) 2630.
- [33] A.J. Mort, D. Zhan, V. Rodriguez, *Electrophoresis* 19 (1998) 2129.
- [34] N. Callewaert, S. Geysens, F. Molemans, R. Contreras, *Glycobiology* 11 (2001) 275.
- [35] J. Plocek, M.V. Novotny, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 215.
- [36] A.H.K. Plaas, V.C. Hascall, R.J. Midura, *Glycobiology* 6 (1996) 823.
- [37] S. Ma, W. Nashabeh, *Anal. Chem* 71 (1999) 5185.
- [38] J. Liu, O. Shirota, M. Novotny, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 223.
- [39] P. Jackson, *Anal. Biochem* 216 (1994) 243.
- [40] H. Schwaiger, P. Oefner, C. Huber, E. Grill, G.K. Bonn, *Electrophoresis* 15 (1994) 941.
- [41] M. Stefansson, M.V. Novotny, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 11573.
- [42] S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, *J. Anal. Biochem* 180 (1989) 351.
- [43] C.R. Noe, J. Freissmuth, *J.Chromatogr. A* 704 (1995) 503.

- [44] C. Huber, E. Grill, P. Oefner, O. Bobleter, *Fresenius J. Anal. Chem.* 348 (1994) 825.
- [45] Y. Mechref, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 15 (1994) 627.
- [46] C. Chiesa, R.A. O'Neill, *Electrophoresis* 15 (1994) 1132.
- [47] F.Y. Che, J-F. Song, R. Zeng, K-Y. Wang, Q-C. Xia, *J. Chromatogr. A* 858 (1999) 229.
- [48] C. Chiesa, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 645 (1993) 337.
- [49] M. Olajos, P. Hajós, G.K. Bonn, A. Guttman *Anal. Chem.* 80 (2008) 4241.
- [50] A. Guttman, F-T.A. Chen, R. A. Evangelista, N. Cooke, *Anal. Biochem.* 233 (1996) 234.
- [51] A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, 763 (1997) 271.
- [52] J. Schwarzer, E. Rapp, U. Reichl, *Electrophoresis* 29 (2008) 4203.
- [53] R.A. Evangelista, A. Guttman, F-T.A. Chen, *Electrophoresis* 17 (1996) 347.
- [54] F.T.A. Chen, R.A. Evangelista, *Anal. Biochem.* 230 (1995) 273.
- [55] M.G. O'Shea, M.K. Morell, *Electrophoresis* 17 (1996) 681.
- [56] Z. Szabo, A. Guttman, T. Rejtar, B.L. Karger, *Electrophoresis* 31 (2010) 1389.
- [57] F-T.A. Chen, R.A. Evangelista, *Electrophoresis* 19 (1998) 2639..
- [58] A. Guttman, F-T. A. Chen, R. A. Evangelista, *Electrophoresis* 17 (1996) 412.
- [59] T.S. Raju, J.B. Briggs, S.M. Borge, A.J. Jones, *Glycobiology* 10 (2000) 477.
- [60] S. Yamamoto, C. Shinohara, E. Fukushima, K. Kakehi, T. Hayakawa, S. Suzuki, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4772.
- [61] A. Bui, B. Kocsis, F. Kilár, *J. Biochem. Bioph. Meth.* 70 (2008) 1313.
- [62] M.A. Kabel, W.H. Heijnis, E.J. Bakx, R. Kuijpers, A.G.J. Voragen, H A. Schols, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 119.
- [63] S. Murray, M. McKenzie, R. Butler, S. Baldwin, K. Sutton, I. Batey, G.M. Timmerman-Vaughan, *Anal. Biochem.* 413 (2011) 104.
- [64] M. Stefansson, *Carbohydr. Res.* 312 (1998) 45.
- [65] C-Y. Wang, Y-Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 431.
- [66] R.A. Evangelista, F-T. A. Chen, A. Guttman, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 273.
- [67] B. Nagels, F. Santens, K. Weterings, E.J.M. Van Damme, N. Callewaert, *Electrophoresis* 32 (2011) 3482.
- [68] S. Ma, W. Nashabeh, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5185.
- [69] R.A. Evangelista, M-S. Liu, F-T. A. Chen, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2239.
- [70] K. Sei, M. Nakano, M. Kinoshita, T. Masuko, K. Kakehi, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 273.
- [71] N. Fraysse, C. Verollet, F. Couderc, V. Poinot, *Electrophoresis* 24 (2003) 3364.
- [72] G. Joucla, T. Brando, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, G. Puze, *Electrophoresis* 25 (2004) 861.
- [73] Y. Zhang, E. Arriaga, P. Driedrich, O. Hindsgaul, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 221.
- [74] X. Le, C. Scaman, Y. Zhang, J. Zhang, N.J. Dovichi, O. Hindsgaul, M.M. Palcic, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 215.
- [75] S. Honda, S. Suzuki, A. Nose, K. Yamamoto, K. Kakehi, *Carbohydr. Res.* 215 (1991) 193.
- [76] R. Evangelista, M.S. Liu, F.-T.A. Chen, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2239.
- [77] R. Evangelista, A. Guttman, F-T.A. Chen, *Electrophoresis* 17 (1996) 347.

6. Conclusion de l'étude bibliographique

La nitrocellulose est un polymère qui présente de nombreuses applications qui dépendent de ses propriétés physico-chimiques et notamment de son taux de nitration. Les nitrocelluloses faiblement nitrées (taux de nitration < 12 %) sont utilisées pour la fabrication de peintures, vernis, laques ou de cigarettes. Les nitrocelluloses hautement nitrées (taux de nitration > 12%) sont utilisées dans les propulseurs et les explosifs civils et militaires.

Même si la nitrocellulose a été découverte il y a presque 200 ans, il n'y a actuellement que très peu de techniques analytiques permettant de la caractériser et de la déterminer avec précision dans les formulations explosives. En effet, les principales difficultés pour l'analyse des nitrocelluloses sont liées à sa masse moléculaire très élevée, sa complexité structurale, ses difficultés de solubilisation et sa dangerosité de manipulation.

La chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse sont les deux techniques les plus utilisées pour l'analyse de la nitrocellulose et de ses additifs de formulation. La chromatographie d'exclusion stérique avec une triple détection est la technique la plus adaptée pour la détermination des paramètres polymères (masses moléculaires, viscosité, indice de réfraction...) de cette macromolécule, sans traitement préalable.

De plus, à cause des propriétés explosives de ce polymère, plusieurs travaux ont été réalisés pour étudier les propriétés thermiques de la nitrocellulose. La TGA, la DSC et la DTA sont les techniques les plus utilisées pour déterminer ces propriétés. La GC-MS a également été utilisée pour évaluer la dégradation thermique de la nitrocellulose. La morphologie de la nitrocellulose a été étudiée par FTIR et par SEM. L'utilisation de techniques spectroscopiques a permis de mettre en évidence la dégradation biologique et mécanique de la nitrocellulose.

Cependant, l'identification de la nitrocellulose dans les explosifs a rarement été réalisée. La FTIR, la MS, l'IMS et la chromatographie ionique sont les techniques jusqu'alors utilisées pour l'analyse de la nitrocellulose hautement nitrée.

Actuellement, peu de travaux ont été effectués pour déterminer le taux de nitration de la nitrocellulose contenue dans les poudres propulsives. Jusqu'à très récemment, la détermination du taux de nitration de la nitrocellulose a été effectuée à partir de la quantification des produits azotés libérés après une hydrolyse alcaline par la méthode de Devarda. Très récemment, une méthode de chromatographie ionique a été proposée pour déterminer les ions nitrite et nitrate libérés, toujours

après hydrolyse alcaline, et une méthode de chromatographie de partage à polarité de phases inversée, corrélant le temps de rétention au taux de nitration vient de faire l'objet d'un brevet.

La caractérisation de la nitrocellulose hautement nitrée présente un grand intérêt criminalistique et juridique pour permettre son identification dans les poudres propulsives et dans les résidus d'explosion. La simple différenciation des nitrocelluloses explosives et non-explosives présente également un grand intérêt. Actuellement, cette différenciation a uniquement été réalisée par spectroscopie Infrarouge sur des échantillons étalons de nitrocellulose de différents taux de nitration.

Compte tenu des travaux jusqu'à présent réalisés, le développement de nouvelles techniques analytiques plus rapides, plus fiables, plus sûres, permettant la caractérisation de la nitrocellulose intacte hautement nitrée reste nécessaire.

PARTIE II : APPROCHES FONDEES SUR L'HYDROLYSE ALCALINE
DE LA NITROCELLULOSE : DETERMINATION DU TAUX DE NITRATION

Introduction

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, les NC, selon leurs taux de nitration, peuvent être utilisées dans des produits usuels (vernis, encres) ou dans des charges explosives (poudres propulsives, dynamites). Il est donc possible de retrouver ces deux types de NC sur une scène d'attentat. La discrimination de ces 2 catégories de NC par le Laboratoire Central de la Préfecture de Police est donc capitale pour conclure sur l'utilisation de la NC dans une charge explosive. Actuellement, il existe peu de méthodes analytiques permettant la détermination du taux de nitration de la NC. La méthode classique, validée, est celle de Devarda [1]. Une méthode simplifiée, proposée récemment [2], consiste à hydrolyser la NC en milieu fortement alcalin ce qui conduit à la libération d'ions nitrite et nitrate qui peuvent finalement être quantifiés par chromatographie ionique. Le taux de nitration de la NC est ensuite déterminé à partir de ces concentrations. Néanmoins, la chromatographie ionique est une technique onéreuse et l'analyse d'échantillons issus de milieux très basiques peut conduire à une diminution de la durée de vie des colonnes. En outre, le protocole global de cette méthode simplifiée n'a pas été validé.

Actuellement, au Laboratoire Central de la Préfecture de Police, la seule technique disponible permettant d'identifier la NC est la chromatographie sur couche mince. Cependant, cette technique ne permet pas la détermination du taux de nitration et donc de discriminer les NC utilisées dans des produits usuels de celles utilisées dans des charges explosives. Dans cette optique l'électrophorèse capillaire, technique miniaturisée, peu coûteuse et adaptée à l'analyse de matrices basiques, a été envisagée pour la première fois pour quantifier les ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse alcaline de la NC. Malgré les quelques publications portant sur la dénitration alcaline de la NC, l'étude des conditions et des rendements de dénitration obtenus est indispensable pour obtenir des taux de nitration répétables tout en limitant la durée de l'analyse. Pour cela, le développement de nouvelles méthodes d'analyse adaptées à l'analyse de matrices très basiques est indispensable tout comme l'évaluation des effets de matrices éventuels. Actuellement, les conditions d'hydrolyse publiées n'ont pas été optimisées, les rendements de dénitration n'ont pas été estimés (la dénitration est considérée comme étant totale) et les effets de matrices n'ont pas été évalués.

Dans cette partie, une nouvelle méthode d'analyse des ions nitrite et nitrate par électrophorèse capillaire pouvant être utilisée pour l'analyse de matrices très basiques (telles que des hydrolysats de NC) sans étape de neutralisation a été développée puis validée. Une approche chimiométrique a été utilisée pour évaluer les effets de matrice. Ensuite, les conditions de dénitration des NC en milieu basique ont été optimisées pour les NC faiblement nitrées puis pour les NC explosives. Pour cela, une

approche multivariée a été envisagée en considérant trois paramètres (température, durée de la réaction et concentration de la soude). Enfin, une nouvelle approche permettant la détermination du taux de nitration basée sur l'étude du ratio molaire des concentrations en ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse alcaline a été développée. Pour conforter la nouvelle stratégie analytique adoptée, un nouveau mécanisme de dénitration des NC selon leur taux de nitration a été proposé. L'ensemble de ces nouvelles méthodes a été appliqué à la détermination du taux de nitration de NC contenues dans des produits usuels (vernis à ongles, membrane, balle de ping-pong, pansement liquide) et dans des poudres propulsives

Références

- [1] Taux d'azote nitrique des nitrocelluloses (méthode de Devarda), GEMO FN-102-A-1, (1989).
- [2] M. López-López, J. M. Ramiro-Alegre, C. García-Ruiz, M. Torre, Anal. Chim. Acta 685 (2011) 196-203.

CHAPITRE I – Détermination du taux de nitration de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire après hydrolyse alcaline (article)

Determination of the nitrogen content of nitrocellulose by capillary electrophoresis after alkaline denitration

Elodie Alinat^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{1,3,4*}, Christine Costanza², Xavier Archer², Pierre Gareil^{1,3,4}

¹Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75231 Paris cedex 05, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), Paris, France

³CNRS, UMR 7195, Paris, France

⁴UPMC, Université Paris 6, Paris, France

Talanta 125 (2014) 174-180

Key words: *nitrocellulose; capillary electrophoresis; nitrogen content; alkaline hydrolysis; gunpowder*

Abbreviations: background electrolyte (**BGE**), capillary electrophoresis (**CE**), dibutylphthalate (**DBP**), dinitrotoluene (**DNT**), diphenylamine (**DPA**), degree of substitution (**DS**), electroosmotic flow (**EOF**), hexadimethrine bromide (**HDMB**), ion chromatography (**IC**), limit of detection (**LOD**), limit of quantitation (**LOQ**), nitrocellulose (**NC**).

Abstract

Nitrocellulose (NC) is a nitrate cellulose ester polymer whose nitrogen content determines its physical and chemical properties, and its industrial applications. For the first time, capillary electrophoresis (CE) was used to quantify nitrite and nitrate ions released after the alkaline hydrolysis of NC to determine its nitrogen content. This article focuses on the development and validation of the CE method adapted to the determination of these anions in basic matrices in 3 min total runtime. Molybdate anion was used as internal standard. The matrix effect in sodium hydroxide solution was statistically studied, demonstrating that no significant effect occurred in 0.5 M sodium hydroxide solution. RSDs on normalized migration times ($n = 20$) were 0.05% for both anions, while RSDs on normalized corrected areas ($n = 20$) were 0.8 and 0.7% for nitrite and nitrate ions, respectively. The selectivity of the CE method was checked in the presence of 10 other anionic species potentially present in post-blast residues. Excellent linearities for normalized corrected areas ($R^2 > 0.999$, residual standard deviations of ca 0.05) were obtained for both anions in the range 5-100 mg L⁻¹. Finally, the

optimized CE method was successfully applied to calculate the denitration yields of two NC standards belonging to the non-explosive and explosive classes, respectively, and to determine the nitrogen content of a NC contained in a single-base gunpowder. CE with its speed, low running costs, and simplicity of use, appears as a valuable alternative to ion chromatography for the nitrogen content determination of pure NCs and NC-based explosives, and more generally, for the determination of nitrite and nitrate ions in other highly alkaline matrices.

1. Introduction

Cellulose nitrate, commonly known as nitrocellulose (NC) is a cellulose ester polymer prepared by the nitration of cellulose, a natural polymer composed of β -1,4 anhydroglucose units. Each dehydrated glucose monomer of cellulose has three reactive hydroxyl groups which are available for esterification [1,2]. Following this esterification reaction, hydroxyl groups of cellulose are replaced by nitro groups. This reaction is realized using various ratios of nitric and sulfuric acid, and cellulose. The acidic medium and the source of cellulose used for synthesis influence the degree of substitution (DS) and therefore the nitrogen content of the final NC. Theoretically, the maximum nitrogen content which can be achieved is 14.14%. However, in practice, the nitrogen content cannot exceed 13.8% [1,2]. Fully nitrated cellulose having a DS of 3 cannot be synthesized because, before completion of this reaction, unstable compounds such as sulfuric esters of cellulose are formed [2].

Physical and chemical properties and industrial application of NC depend on its nitrogen content. Indeed, NCs with a nitrogen content less than 12.5% are widely used as raw material in daily use products (printing inks, paints, lacquers, varnishes and filter membranes), whereas highly-nitrated NCs (nitrogen content > 12.5%) are employed in the manufacturing of explosive materials such as smokeless gunpowders and dynamites. Therefore, and also for regulation reasons, methods for the determination of nitrogen content in NCs are needed. To date, the reference method for this determination is still the long and tedious Devarda's method, based on alkaline denitration of NC in the presence of hydrogen peroxide, reduction of the released nitrate ions into ammonia by Devarda alloy, and back-titration of sulfuric acid added in excess to ammonia by sodium hydroxide [3]. However, for direct NC analysis, Vibrational spectroscopy [3,4,5], mass spectrometry [6-8], gas chromatography [9-13], reversed phase [14,15], ion [16-19], and size exclusion [20,21] chromatography, and capillary electrophoresis [22,23] have all been used. NCs are always present in gunpowders, which are commonly classified according to the number of energetic material in their formulation: i) single-base propellants, which mainly contain NC, ii) double base propellants, consisting of NC and nitroglycerin, and iii) triple base propellants, containing NC, nitroglycerin, and nitroguanidine [24,25]. Various

additives such as stabilizers, flash suppressants, deterrents, plasticizers, and inert material are added to enhance performance. Although NC is the main constituent of gunpowders, few studies focusing on the analysis of NC in NC formulations are available in literature, likely because of difficulties encountered in sample treatment.

As NCs are widely used in industry, large quantities of unusable or waste NCs are generated and have to be destroyed by inexpensive, efficient, and environmentally suitable processes. Various chemical and biological pathways have been used to remove NCs [26,27]. Better treatment efficiencies are obtained when both pathways are combined [28,29,30]. Unlike cellulose, NC is very resistant to microbial degradation due to the conformational rigidity of the molecule [18]. The chemical processes are based on alkaline or acid hydrolysis. However, acid denitration of NC is much slower than alkaline hydrolysis [29]. The reaction between NC and an alkaline agent leads to denitration and breakdown of the structural backbone of cellulose. Following this reaction, various organic and inorganic products are released [28]. Among the post-hydrolysis products, nitrite and nitrate ions are the main compounds containing nitrogen. Previous works considered the effect of temperature, reaction time, type and concentration of bases on the denitration yield [17,18,28,29,31,32]. Results showed that NaOH and KOH at comparable concentration levels are more effective than $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and NH_4OH [17,18,32]. Alkaline denitration without hydrogen peroxide has also been used as an analytical route to determine NC nitrogen contents [18], as it is likely safer to control than in the presence of that. So far, in all of these studies, nitrite and nitrate concentrations were monitored by ion chromatography (IC).

Capillary electrophoresis (CE) is commonly employed for inorganic ion analysis, as a simple alternative to IC, particularly in environmental field. Especially, CE has already been reported for the determination of nitrite and nitrate ions [33-45]. As the absolute mobilities of both anions are rather close, acidic background electrolytes are preferably used, to take benefit from the weakly acidic properties of nitrite anion. As compared to IC, the use of CE for the analysis of nitrite and nitrate ions presents advantages such as simpler sample preparation, shorter analysis times, miniaturized operational conditions, and much lower running cost.

This paper focuses on the development of a new CE method adapted to the simultaneous analysis of nitrite and nitrate ions contained in basic matrices such as those originating from the alkaline hydrolyses of NCs. This method was successfully optimized with hydrolyzed NC standards. For the first time, it was then applied to NC extracted from a gunpowder to determine its nitrogen content. Applications of this to the determination of nitrite and nitrate anions in other basic matrices can also be contemplated.

2. Materials and methods

2.1. Standards and electrolytes

NC standards with nitrogen contents of 11.14% (NC1, DS = 2.0, $M_w = 20\,000\text{ g mol}^{-1}$) and 13.42% (NC2, DS = 2.8, $M_w = 69\,000\text{ g mol}^{-1}$) were given by the Central Laboratory of Police Prefecture (Paris, France). NC standards were received with a damping agent (water for NC2 or ethanol for NC1) content of approximately 30%. Sodium nitrite (> 97%), sodium nitrate (> 99%), sodium perchlorate (99%), sodium chlorate (99%), sodium chloride (> 99.5%), sodium iodide (99.5%), sodium bromide (99%), oxalic acid (99%), hexadimethrine bromide (HDMB) used as electroosmotic flow (EOF) reversal agent, and sodium molybdate dihydrate ($\geq 99.5\%$) used as internal standard were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Sodium sulfate (> 99.5%) and sodium thiocyanate ($\geq 98.5\%$) were supplied by Merck (Fontenay-sous-Bois, France). Concentrated volumetric solutions (Convol Normadose®) of 1 M sodium hydroxide used as base for NC hydrolysis were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

Stock solutions at 1000 mg L^{-1} of nitrite, nitrate, and molybdate ions were prepared weekly by dissolving the appropriate amount of sodium salt in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3-UV system (Millipore, Molsheim, France) and stored at 4°C . HDMB solution at 1 g L^{-1} was prepared weekly by dissolving 0.01 g in 10 mL of ultra-pure water and stored at 4°C . Sodium phosphate monobasic (> 99%) and sodium phosphate dibasic (> 99%) from Sigma Aldrich were used for electrolyte preparations. Stock solution of 77.4 mM (200 mM ionic strength) phosphate buffer (pH 7.7) was prepared by mixing the appropriate amount of sodium phosphate monobasic and sodium phosphate dibasic in ultra-pure water. Background electrolytes (BGE) were prepared daily by dilution from the stock solution at 200 mM ionic strength and filtered through a $0.20\text{ }\mu\text{m}$ cellulose acetate membrane (VWR).

2.2. Instrumentation

An oven (model UNB100) from Memmert (Schwabach, Germany) was used to remove damping agent from NC samples. Alkaline hydrolysis experiments were achieved with a block heater (model SBH 130D) from Stuart (Staffordshire, UK) capable of receiving twelve 10-mL glass tubes.

Two capillary electrophoresis instruments were employed in this study. An Agilent HP^{3D}CE system (Massy, France) equipped with a photodiode array (PDA) detector was used for the development of the CE method and a Beckman Coulter® P/ACE MDQ system (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with a PDA absorbance detector was used for the validation of CE method and real samples

analysis. Instrument control and data acquisition were performed using Chemstation B.02.01 (Agilent) and 32 Karat® 8.0 (Beckman Coulter) softwares.

2.3. Electrophoretic procedures

Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with an inner diameter of 50 μm and an outer diameter of 365 μm were used throughout this study. Conditions retained as optimum on Beckman instrument for subsequent validation were as follows. New capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution at 1 g L⁻¹ and finally the BGE, each under 14.5 psi (~ 1 bar) for 10 min (15 capillary volumes for a 60 cm long capillary). The optimized BGE consisted of 38.7 mM (100 mM ionic strength) sodium phosphate buffer at pH 7.7. Between each run, the capillary was flushed with HDMB solution under 14.5 psi for 1 min (ca 1.5 capillary volumes) followed by the BGE under 14.5 psi for 2 min (ca 3 capillary volumes). Samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection for 3 s at 0.5 psi (~ 35 mbar) (< 0.3% of capillary volume). The selected voltage was -30 kV (reversed polarity) and the capillary cartridge was thermostated at 25°C. The detection wavelength was 210 nm with the reference set at 310 nm and bandwidths set at ± 10 nm and ± 40 nm, respectively. The rate of data collection was 8 Hz. After the last analysis of the day, capillary was rinsed with water under 14.5 psi for 10 min and stored overnight in the apparatus with both ends dipped in water.

2.4. Alkaline hydrolysis of NC standards

Before hydrolysis, to remove wetting agent, about 40 mg of wetted NC were placed in weighted 10-mL glass tubes and dried at constant weight in an oven at 100°C for 2 h. Next, tubes containing dry NC were stored for 25 min in a glass desiccator to reach room temperature. The glass tubes containing dry NC were weighed again to obtain the exact amount of NC used for the assays of alkaline hydrolysis. Then, five milliliters of a fixed concentration of sodium hydroxide solution were carefully added into each tube containing NCs and the tubes were screw-capped. The stopped tubes were placed in the block heater to allow hydrolysis to proceed for a fixed time at a fixed temperature within the studied range (1-4 h, 60-90°C). When the experiment was over, the tubes were transferred in an ice bath for 15 min to quickly cool down the reaction mixture and thus stop denitration. After 25 min at room temperature, 250 μL of the hydrolysates were transferred into volumetric flasks of 10 mL containing 200 μL of the internal standard solution at 1000 mg L⁻¹ and supplemented to the mark with ultra-pure water. Finally, the hydrolysates were analyzed by CE to determine nitrite and nitrate ion concentrations. A filtration step was not necessary because the fiber dissolution was total.

2.5. Single-base gunpowder extraction and alkaline hydrolysis

A single-base gunpowder (containing NC, diphenylamine (DPA), dibutylphthalate (DBP), dinitrotoluene (DNT), potassium sulphate, calcium carbonate, and graphite) was provided by the Central Laboratory of Police Prefecture (Paris, France). Prior to hydrolysis, the single-base gunpowder was subjected to solvent extractions to isolate NC from the sample matrix, applying a protocol that was adapted from [24]. Figure II-I-1 summarizes the useful steps to isolate NC from single-base gunpowder. About 0.2 g of gunpowder was introduced into a glass beaker. Then, 5 consecutive solvent extractions were needed to remove organic and ionic components: three extractions with methanol (18 mL, sonication for 10 min at 35°C) and two extractions with water (18 mL, sonication for 10 min at 35°C). Most of the solid NC was recovered after decantation, divided approximatively equally into three previously weighted 10-mL glass tubes, and dried at constant weight in an oven at 100°C for 2 h. After the drying step, the glass tubes containing dry NC were weighed again to get the exact amount of NC used to implement alkaline hydrolysis. Next, 5 mL of 3 M sodium hydroxide solution were added into each tube and the tube were screw-capped. The glass tubes were placed in the block heater to allow hydrolysis to proceed for 2.5 h at 75°C. At the end of the hydrolysis, the tubes were transferred in an ice bath for 15 min to quickly cool down the reaction mixture and thus stop denitration. After 25 min at room temperature, 2500 µL of the hydrolysates were transferred into volumetric flasks of 10 mL containing 200 µL of the internal standard solution at 1000 mg L⁻¹, and supplemented to the mark with ultra-pure water.

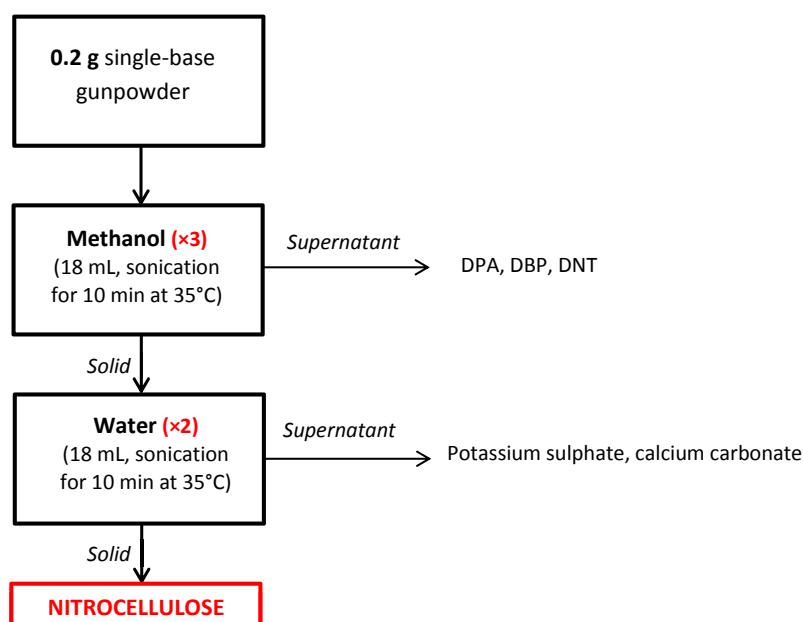


Figure II-I-1. Diagram summarizing the different steps to extract NC from single-base gunpowders composed of nitrocellulose, dinitrotoluene, diphenylamine, dibutylphthalate, salts (potassium sulphate, calcium carbonate), and graphite.

2.6. Safety considerations

NC in dry state is a highly flammable solid that ignites easily and burns explosively when is concealed. This is why it should always be stored wet. NCs having nitrogen content higher than 12.5% are classified as explosives. NC can be ignited by flame, heat, shock, friction, sparks or static electricity. Its explosive propensity depends on the nitrogen content. The higher the nitrogen content, the easier it can explode. Special attention was paid to keep NC samples wet when stored in a refrigerator and to weigh them after drying in the desiccator to avoid any shock. Security glasses and protection clothes were worn by the operator. In addition, weighing of dry matter was always performed under the assistance of a person equipped with a water vaporizer to prevent from any fire start. Working under less than 30 mg dry matter considerably reduces hazard risks. Indeed, it is worthy of note that no incident has occurred over more than one hundred assays that have been realized to date under these experimental conditions.

2.7. Calculation of the denitration yield of alkaline hydrolysis of NC standards

Quantitation of nitrite and nitrate ions in the post-hydrolysis solution was performed by the external standardization calibration method with aqueous standard solutions of nitrite and nitrate ions having concentration from 5 to 100 mg L⁻¹ (5 concentration levels). Molybdate anion was used as internal standard. Analyses were carried out in triplicate and the calibration curves were obtained by plotting normalized corrected areas (analyte peak area divided by its migration time and by the internal standard peak area divided by its migration time) against concentration and using the least-squares regression method. The denitration yield was calculated from nitrite and nitrate concentrations, the nitrogen content given by the manufacturer, and the exact amount of dry NC used for the assay of alkaline hydrolysis, according to equation (1):

$$Yield = \frac{\% N \text{ experimental}}{\% N \text{ manufacturer}} = \frac{\left(\frac{([NO_2^-] \times f \times M_N \times V_{NaOH})}{M_{NO_2} \times 10^6} + \frac{([NO_3^-] \times f \times M_N \times V_{NaOH})}{M_{NO_3} \times 10^6} \right)}{\% N \text{ manufacturer} \times m_{NC}} \times 100 \quad (1)$$

where %N experimental is the nitrogen content obtained experimentally, %N manufacturer the nitrogen content given by the manufacturer, [NO₂⁻] and [NO₃⁻] the concentrations of nitrite and nitrate ions in mg L⁻¹, f the dilution factor, M the molecular mass, V_{NaOH} the volume of sodium hydroxide in mL and m_{NC} the amount of dry NC in gram.

2.8. Calculation of the nitrogen content of NC contained in gunpowder

The nitrogen content of NC contained in the single-base gunpowder was calculated according to equation (2):

$$\% N \text{ experimental} = \frac{\left(\frac{([NO_2^-] \times f \times M_N \times V_{NaOH})}{M_{NO_2} \times 10^6} + \frac{([NO_3^-] \times f \times M_N \times V_{NaOH})}{M_{NO_3} \times 10^6} \right)}{m_{NC} \times \eta} \times 10^4 \quad (2)$$

where $[NO_2^-]$ and $[NO_3^-]$ were the concentrations of nitrite and nitrate ions in mg L^{-1} , f the dilution factor, M the molecular mass, V_{NaOH} the volume of sodium hydroxide in mL, m_{NC} the amount of dry NC in gram and η the denitration yield.

2.9. Statistical approach of matrix effects

To study matrix effects, five repeated injections for five concentration levels (5, 10, 20, 50, and 100 mg L^{-1}) of nitrite and nitrate ions in ultra-pure water for the standard calibration and three repeated injections at five concentration levels (5, 10, 20, 50, and 100 mg L^{-1}) in sodium hydroxide at 0.5 mol L^{-1} were carried out. The statistical comparison of the regression lines (residual variances, slopes, intercepts) was performed applying appropriate tests using Excel® software (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

3. Results and discussion

3.1. CE method development

Various methods for the determination of nitrite and nitrate ions by CE have been developed [33-45]. Among these, some of them involved the use of low pH electrolytes. Indeed, both anions have very close absolute mobilities (74.6 (nitrite) and 74.1 (nitrate) $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C [46]) and the use of low pH electrolytes can selectively decrease the mobility of nitrite ions due to its weakly acidic property ($\text{pK}_a = 3.22$ at 25 °C [46]), thus improving the resolution of this pair of ions, in the migration order of nitrate first, nitrite next. For the purpose of this work and in spite of the fact that nitric and nitrous acids are completely dissociated at pH higher than 5.3, acidic electrolytes were not advocated owing to the highly basic sample matrices of NC hydrolysates. Sodium phosphate buffer was selected as BGE for its high UV transparency and its buffering capacity at pH close to its pK_a (7.2 at 25 °C) at a constant pH value of 7.7. Separations were performed at a pH value of 7.7 to promote the presence of monohydrogen phosphate ion (absolute mobility, $61.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C [46]) with respect to dihydrogen phosphate ion (absolute mobility, $35.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C [46]), and thus better adapted co-ion mobility to analyte mobilities, resulting in improved peak symmetries. The effect of BGE pH was not investigated around this pH value, as it was expected not to influence selectivity, because of the full dissociation of nitric and nitrous acids. To significantly reduce the analysis time, EOF was reversed using a dynamic coating of the capillary by hexadimethrine bromide, so that nitrite and nitrate ions will migrate in the same direction as the EOF. Method development was performed with

the Agilent instrument. Capillary length was varied within the range of from 35 to 50 cm and BGE ionic strength within the range of from 10 to 100 mM, in order to find out baseline separation while keeping short analysis time. Eventually, a resolution of 2.8 between nitrite and nitrate ions (in that order) was achieved in less than 2.5 min using a 60 mM ionic strength phosphate buffer, pH 7.7, with a 50 cm long capillary (41.5 cm to the detector) and the temperature set at 25 °C. The maximum voltage that can be applied under these conditions without noticing detrimental effect of Joule heating was -16 kV. Samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection for 3 s under 35 mbar, which represents a sample volume of the order of 0.3% of capillary volume, preventing band spreading. Before each analysis, the capillary coating layer was regenerated by applying a rinse step with a HDMB solution at 1 g L⁻¹ under 960 mbar for 2 min. This markedly improved migration time repeatability (see § 3.2.5). Maximum absorbances for nitrite and nitrate ions were obtained at 210 and 202 nm, respectively. As hydroxide ion, which was present at high concentration in the targeted sample matrices, strongly absorbs below 205 nm, a single detection wavelength, 210 nm, was preferred for the determination of both ions of interest. Among contemplated anions meeting mobility and absorbance requirements for use as internal standard (molybdate, thiocyanate and oxalate), molybdate was selected, as it was the only one not being potentially encountered in post-blast residues.

For routine analysis, the method was transferred from the Agilent to the Beckman apparatus, in view of method transfer to the laboratory of police (LCPP). Capillary length and BGE ionic strength were adjusted to keep comparable resolution and analysis time. The best final separation conditions were found to be 100 mM ionic strength phosphate buffer at pH 7.7 with a 60 cm long (50 cm to the detector) capillary, thus affording still higher buffering capacity with respect to highly alkaline matrices. The applied voltage could be raised to – 30 kV, thanks to more efficient liquid cooling of this apparatus. The length of the detection window was 800 µm. Other parameters were kept unchanged. A typical electropherogram of a standard mixture of nitrite and nitrate ions, along with the internal standard (molybdate anion), is depicted in Figure II-I-2a. As can be seen, the whole separation, including molybdate ion, is completed within 2 min, which is much faster than IC (ca 14 min [18]).

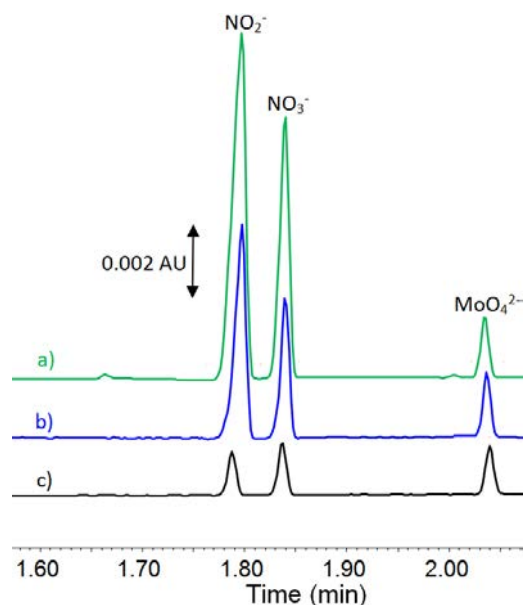


Figure II-I-2. Electropherograms of (a) a standard mixture of nitrite, nitrate (at 5 mg mL^{-1} in water), and molybdate ions (at 20 mg mL^{-1} in water), (b) an alkaline hydrolysate of NC2 standard diluted 40 times with water and spiked with MoO_4^{2-} at 20 mg mL^{-1} , and (c) an alkaline hydrolysate of gunpowder extract spiked with MoO_4^{2-} at 20 mg mL^{-1} and diluted 4 times with water. CE conditions: bare-fused silica capillary, $50 \mu\text{m ID} \times 60 \text{ cm}$ (detection at 50 cm); electroosmotic flow reversal with 1 g L^{-1} HDMB; BGE: 100 mM ionic strength sodium phosphate buffer, $\text{pH } 7.7$; temperature: 25°C ; applied voltage: -30 kV ; hydrodynamic injection, 0.5 psi , 3 s ; detection: UV at 210 nm . Hydrolysis conditions: 3 M NaOH for 2.5 h at 75°C .

3.2. Method validation

3.2.1. Linearity

Calibration curves were obtained using 5 standard solutions prepared in ultra-pure water in concentrations ranging from 5 to 100 mg L^{-1} . This concentration range allows the determination of both ions in the NC hydrolysates obtained from NC standards (diluted 40 fold before analysis) or real formulated samples. The linearity of the method was evaluated by plotting normalized corrected areas against analyte concentration and using the least-squares method. Concentrations and normalized corrected areas correlated linearly in the studied range, as testified by determination coefficients, and residual standard deviations given in Table II-I-1.

Parameter	Ions	
	Nitrite	Nitrate
Slope ($b \pm s_b$)	0.0989 ± 0.0007	0.1118 ± 0.0006
Intercept ($a \pm s_a$)	0.0742 ± 0.0345	0.1005 ± 0.0320
R^2	0.9998	0.99991
Residual standard deviation	0.0532	0.0492

Table II-I-1: Linear regression calibration parameters for nitrite and nitrate ions for five concentration levels between 5 and 100 mg mL^{-1} . Experimental conditions: see Figure II-I-2.

3.2.2. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)

The LODs in standard mixtures were evaluated as a concentration of nitrite and nitrate ions corresponding to a signal to noise ratio of 3. LODs of 1.1 and 0.8 mg L⁻¹ were obtained for nitrite and nitrate ions, respectively. The limits of quantitation (LOQs) in ultra-pure water, based on a signal-to-noise ratio of 10 were 3.5 and 2.5 mg L⁻¹ for nitrite and nitrate ions, respectively. These values were sufficiently low for the determination of nitrite and nitrate ions in the NC hydrolysates. This is why no attempt was undertaken to lower them further.

3.2.3. Matrix effects

To evaluate a possible influence of basic matrices on quantitation, the calibration curves obtained from least-squares method with standard solutions prepared both in ultra-pure water and in 0.5 M sodium hydroxide were statistically compared. This concentration was deemed high enough taking into account the dilution factor of 40 that can be applied to NC hydrolysate samples, which would make this diluted basic matrix consistent with an initial sodium hydroxide concentration of 20 M. It is very likely that this concentration largely outpaces those to be used to hydrolyse NCs. The setup of this comparison includes three successive steps: (i) the residual variances of the regressions must be homogeneous (comparison using a bilateral F-test), (ii) if the residual variances of the regression are homogeneous, the slopes of the regression lines are compared (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the slopes as denominator) and (iii) if the slopes are equals, the intercepts are compared (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the intercepts as denominator). Then, the two calibration curves are considered as comparable only if residual variances, slopes, and intercepts of the regression lines are not significantly different. All statistical tests were performed with a first-kind risk set at 5%. No significant matrix effect was observed for both nitrite and nitrate ions at this level of hydroxide ion concentration. So, it can be concluded that calibration curves obtained in pure water can be used to quantify nitrite and nitrate ions in the alkaline hydrolysates of NCs. These conditions may also be of interest for other applications in basic matrices.

3.2.4. Selectivity

The method was developed with a mixture containing only nitrite and nitrate ions plus molybdate ion, used as internal standard. Common post-blast residues potentially contain other anions that may interfere with the separation and detection of nitrite and nitrate ions [47]. Therefore, bromide, iodide, thiocyanate, cyanate, oxalate, azide, chloride, sulfate, perchlorate, and chlorate ions were tested at the 10 mg L⁻¹ level. From these, only bromide, iodide, azide, oxalate, and thiocyanate absorb at 210 nm and can therefore be detected. In addition to this, it was checked the presence of the UV-transparent anions (cyanate, chloride, sulfate, perchlorate, and chlorate) neither perturb the baseline at the

migration time of the three anions of interest, nor alter their peak areas. Figure II-I-3 presents the resulting electropherogram of a standard mixture of the 13 anions. Eventually, none of these added anions interfered with the separation of nitrite, nitrate, and molybdate ions, showing the good selectivity of the CE method. The advantage of using direct UV detection, which leaves many potentially interfering anions undetected, over indirect UV detection of classical CE methods is clearly emphasized here.

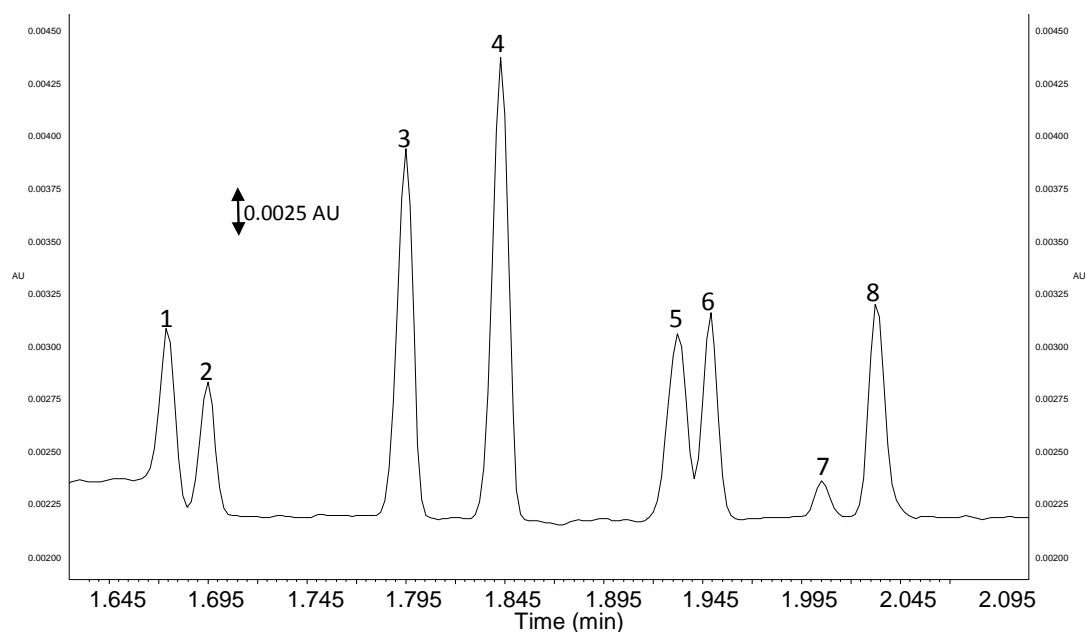


Figure II-I-3. Electropherogram of a standard mixture of nitrite, nitrate, and molybdate ions + 10 supplementary anions, potentially found in post-blast residues, all at 10 mg mL⁻¹ in water. CE conditions: see Figure II-I-2. Identification : bromide (1), iodide (2), nitrite (3), nitrate (4), azide (5), oxalate (6), thiocyanate (7), and molybdate (8). Cyanate, chloride, sulphate, perchlorate, and chlorate are not detected.

3.2.5. Repeatability

Repeatabilities on migration times, normalized migration times, corrected peak areas and normalized corrected areas are given in Table II-I-2 for a standard mixture of nitrite, nitrate, and molybdate ions at 20 mg L⁻¹ each in 0.5 M sodium hydroxide. Satisfactory results were obtained, with RSDs on normalized corrected areas less than 1%. These data also show the interest of using the internal standard method to compensate for migration speed and injected volume variations. It is also worthy of note that RSDs on corrected areas higher than 5% were obtained in the absence of a refreshment of the capillary coating between each injection (see § 2.3 and 3.1), although HDBM is usually considered in the literature [48] as a semi-permanent coating agent.

RSD (%) (n = 20)	Ions	
	Nitrite	Nitrate
Corrected areas	3.1	3.1
Normalized corrected areas	0.8	0.7
Migration times	0.3	0.3
Normalized migration times	0.1	0.1

Table II-I-2: Repeatabilities on migration times, normalized migration times, corrected peak areas, and normalized corrected areas for a standard mixture of nitrite, nitrate, and molybdate ions at 20 mg L⁻¹ each in 0.5 M sodium hydroxide. Molybdate ion was used as internal standard to normalize peak areas and migration times. Experimental conditions, see Figure II-I-2.

3.3. Application to real samples

3.3.1. Hydrolysis of NC standards

The method previously validated was then applied to the determination of nitrogen contents of NC standards. Based on the results published in literature, sodium hydroxide concentration, reaction time and temperature have significant effects on the NC denitration yield [17,18,26-29]. To get the highest and most reproducible denitration yields, the effects of these three parameters on denitration yields were studied. The extreme values for each of the three parameters were selected according to the data obtained in literature and preliminary hydrolysis studies. For sodium hydroxide, the low and high concentration levels were chosen to obtain complete solubilization of NC at 8 g L⁻¹ (40 mg / 5 mL) at the end of the hydrolysis, to minimize perturbations of the denitration reaction by too viscous alkaline media, and be sure not to encounter matrix effect during CE analysis. Accordingly, experiments were carried out with sodium hydroxide concentrations ranging from 1 to 5 M. Reaction time was varied between 1 and 4 h. Indeed, a minimum of 1 h was necessary to ensure good solubility of cellulosic backbone at the end of the denitration and reaction times greater than 4 h did not appear reasonable. Finally, NC hydrolysis were carried out by varying temperature in the range of 60 to 90°C. The maximum value was set at 90°C to prevent from NC decomposition and minimize explosion hazards. Temperatures lower than 60°C led to too long hydrolysis times to reach high denitration yields. The effects of temperature, sodium hydroxide concentration, and reaction time on the denitration yields were studied separately with the other two parameters held constant and the results are summarized in Tables II-I-3, II-I-4 and II-I-5. A typical resulting electropherogram obtained from NC2 hydrolysate is shown in Figure II-I-2b. For all conditions studied, the obtained denitration yields (calculated according to equation 1) ranged from 76 to 84%, and the RSDs on the denitration yields calculated from the three repetitions of the hydrolysis protocol were 1.8% and 1.4% for NC1 and NC2, respectively, which appears to be very satisfactory.

Based on the denitration yields obtained under the nine investigated hydrolysis conditions, the effects of sodium hydroxide concentration, reaction time, and temperature on denitration yields cannot be clarified further by this monovariate study.

NC	Reaction time (h)	Denitration yield (%)
NC1	1	79 ± 2
	2.5	84 ± 2
	4	80 ± 2
NC2	1	82 ± 1
	2.5	83 ± 1
	4	83 ± 1

Table II-I-3: Denitration yields (% ± one standard deviation, n = 3) obtained for nitrocelluloses NC1 and NC2 after alkaline hydrolysis at 65°C with 3 M NaOH and for different reaction times.

NC	Temperature (°C)	Denitration yield (%)
NC1	60	76 ± 2
	75	84 ± 2
	90	81 ± 2
NC2	60	82 ± 1
	75	83 ± 1
	90	84 ± 1

Table II-I-4: Denitration yields (% ± one standard deviation, n = 3) obtained for NC1 and NC2 after alkaline hydrolysis with 3 M NaOH for 2.5 h and at different temperatures.

NC	[NaOH] (M)	Denitration yield (%)
NC1	1	81 ± 2
	3	84 ± 2
	5	81 ± 2
NC2	1	82 ± 1
	3	83 ± 1
	5	84 ± 1

Table II-I-5: Denitration yields (% ± one standard deviation, n = 3) obtained for nitrocelluloses NC1 and NC2 after alkaline hydrolysis at 75°C for 2.5 h and with different concentrations of sodium hydroxide.

3.3.2. Hydrolysis of NC contained in gunpowder

A single-base gunpowder containing a highly-nitrated NC was first extracted three times independently, next each extract was hydrolyzed according to the protocol described in § 2.5, and finally each hydrolysate was analyzed three times using the optimized CE method. Alkaline hydrolysis was performed with 3 M sodium hydroxide, at 75 °C and for 2.5 h, as these conditions led to the same denitration yield, whatever the nitrogen content of the NC (see Tables II-I-3-5). A typical electropherogram of the hydrolyzed gunpowder extract is presented in Figure II-I-2c. As can be seen,

no additional peak from the matrix interferes with these of nitrite and nitrate ions in the hydrolysate, thus making it possible quantitation of these anions. The nitrogen content of the NC used in this gunpowder was calculated from the determination of nitrite and nitrate ions and a value of 0.83 for the denitration yield under the conditions employed (see Tables II-I-3-5), according to equation (2) and the results are reported in Table II-I-6.

	Nitrogen content (%) This work	Nitrogen content (%) Manufacturer data
Hydrolysis 1	13.56 ± 0.06	
Hydrolysis 2	13.73 ± 0.06	13.20 ± 0.05
Hydrolysis 3	13.25 ± 0.04	

Table II-I-6: Nitrogen content of the NC used in a gunpowder as obtained from three alkaline extractions followed by CE (this work), and as given by the manufacturer (Devarda's method).

As expected, the obtained nitrogen contents are greater than 12.5%, demonstrating the presence of an explosive NC. The mean value of nitrogen content obtained from the three independent extractions is 13.5%, with a standard-deviation of 0.3% (RSD, 1.8%). The RSDs on normalized corrected peak areas for nitrite and nitrate ions were 0.5% and 0.4%, respectively (n=3), while the RSDs on corrected migration times for nitrite and nitrate ions were 0.07% and 0.05%, respectively (n=3). The experimental nitrogen content obtained from this work is in close agreement with that claimed by the manufacturer (determined by Dewarda's method), thus demonstrating the effectiveness of this new whole protocol (alkaline hydrolysis followed by CE) for the determination of the nitrogen content of NCs contained in formulated samples.

4. Conclusions

A new and simple CE method was developed for the quantitation of nitrite and nitrate ions released by the alkaline hydrolysis of NCs. This method is based on the use of a 100 mM ionic strength, pH 7.7 phosphate buffer, able to accommodate highly alkaline sample matrices (0.5 M sodium hydroxide), and allowing direct absorbance detection of both anions of interest, which provides a high degree of selectivity. The method was validated with respect to linearity, limits of detection and quantitation, repeatability, and selectivity. In addition to this, no significant matrix effect was observed with 0.5 M sodium hydroxide. This CE method, which compares favorably with IC, was successfully used for the study of the alkaline hydrolysis of pure NCs and the determination of the denitration yields, obtained under various conditions of sodium hydroxide concentration, temperature, and time. It was next applied to the determination of the nitrogen content of a NC used in a single-base gunpowder and results in close agreement with the value given by the manufacturer were obtained.

Nevertheless, the monovariate approach implemented so far to study the denitration reaction of NC in alkaline medium has not allowed to clarify the influence of the abovementioned three parameters, and to identify the conditions providing the highest denitration yield. Also, a design-of-experiment approach is underway in our lab to unravel the actual effects of these factors, and the present CE method, due to its speed, cost-effectiveness, miniaturization, and simplicity, appears to be the method of choice to monitor this reaction.

References

- [1] M.A. Fernández de la Ossa, M. López- López, M. Torre, C. García-Ruiz, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1740-1755.
- [2] C.W. Saunders, L.T. Taylor, *J. Energy. Mater.* 8 (1990) 149-201.
- [3] GEMO FN-102-A-1 (1989).
- [4] D.S. Moore, S.D. McGrane, *J. Mol. Struct.* 561 (2003) 661-662.
- [5] D. Dolinak, S.H. Wise, C. Jones, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 29 (2008) 312-319.
- [6] K. Hakansson, R.V. Coorey, R.A. Zubarev, V.L. Talrose, P. Hakansson, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 337-346.
- [7] C.M. Mahoney, G. Gillen, A.J. Fahey, *Forensic Sci. Int.* 158 (2006) 39-51.
- [8] W.Meier-Augenstein, M.F. Kemp, C.M. Lock, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 23 (2009) 2011-2016.
- [9] D.M. Cropek, P.A. Kemme, J.M. Day, National Technical information Service of the US Departement of Commerce, technical report ADA 398732 (sept 2001)
- [10] D.M. Cropek, J.M. Day, P.A. Kemme, Incineration by-products of AA2, NC fines and NG slums, National Technical Information Service of the US Department of Commerce, technical report ADA 395160 (2001)
- [11] D.M. Cropek, P.A. Kemme, J.M. Day, J. Cochran, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4346-4351.
- [12] K. Katoh, L. Le, M. Kumasaki, Y. Wada, M. Arai, M. Tamura, *Thermochim. Acta* 431 (2005) 161-167.
- [13] K. Katoh, L. Lu, Y. Wada, M. Arai, M. Tamura, *Thermochim. Acta* 431 (2005) 173-176.
- [14] M.T. Combs, United States Patent WO2013006218 A1
- [15] P.V. Rooijen, Characterization of nitrocellulose by 2D-HPLC (2013) Bachelor thesis, University of Amsterdam (downloaded in December 2013 from www.science.uva.nl/onderwijs/.../f1544880797.pdf)
- [16] D. Cropek, B. Dankowski, Sonolysis of nitrocellulose fines, US Army Corps of Engineers, Engineer Research and Development Center, Technical report ERDC/CERL TR-00-14 (May 2000)
- [17] D.K. MacMillan, C.R. Majerus, R.D. Laubscher, J.P. Shannon, *Talanta* 74 (2008) 1026-1031.
- [18] M. López- López, J.M. Ramiro Alegre, C. García-Ruiz, M. Torre, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 196-203.
- [19] D.L. Freedman, J.M. Cashwell, B.J. Kim, *Waste Manage.* 22 (2002) 283-292.
- [20] P. Deacon, A. Macdonald, P. Gill, N. Mai, M.A. Bohr, H. Pontius, M. Hust, W. Klerk, C. Bater, *STANAG* 4178 (ED2) (2009).
- [21] M. Marx-Figini, O. Soubélet, *Polym. Bull.* 6 (1982) 501-508.
- [22] M.A. Fernández de la Ossa, F. Orteja-Ojeda, C. García-Ruiz, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 197-204.
- [23] M.A. Fernández de la Ossa, M. Torre, C. García-Ruiz, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 149-155.
- [24] M. López- López, M.A. Fernandez de la Ossa, J. Saiz Galindo, J.L. Ferrando, A. Vega, M. Torre, C. García-Ruiz, *Talanta* 81 (2010) 1742-1749.
- [25] M. López- López, J.L. Ferrando, C. García-Ruiz, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 92-99.
- [26] P.A. Riley, D.L. Kaplan, A.M. Kaplan, Stability of nitrocellulose to microbial degradation, United States Army Natick (1984), Technical Report NATICK/TR-85/004.
- [27] B.W. Brodman, M.P. Devine, *J. Appl. Polymer. Sci.* 26 (1981) 997-1000
- [28] C. Christodoulatos, T. Su, A. Koutsospyros, *Water. Environ. Res.* (2001) 185-191.
- [29] B.J. Kim, J.E. Alleman, D.M. Quivey, Alkaline hydrolysis/Biodegradation of nitrocellulose fines, National Technical Information Service of the US Department of Commerce, technical report ADA 359192 (Aug 1998)
- [30] B.J. Kim, H.N. Hsieh, F.J. Tai, Aerobic digestion and acid hydrolysis of nitrocellulose, US Army Corps of Engineers, CERL technical report 99/45 (April 1999).
- [31] T.L. Su, C. Christodoulatos, Destruction of nitrocellulose using alkaline hydrolysis, National Technical Information Service, US Department of Commerce, ADP017728 (May 1996).
- [32] M. Raesi, G.D. Najafpour, *Iranica J. Energy and Environ.* 2 (2011) 221-228.

- [33] Y. Tanaka, N. Naruishi, H. Fukuya, J. Sakata, K. Saito, S. Wakida, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 193-197.
- [34] P.N. Bories, E. Scherman, L. Dziedzic, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 9-14.
- [35] G. Zunic, S. Spasic, Z. Jelic-Ivanovic, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 73-79.
- [36] P.A. Marshall, V. Craige Trenerry, *Food Chem.* 57 (1996) 339-345.
- [37] A. Gáspár, P. Juhász, K. Bágyi, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 327-331.
- [38] N. Oztekin, M. Said Nutku, F. Bedia Erim, *Food Chem.* 76 (2002) 103-106.
- [39] J.E. Melanson, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 311-316.
- [40] C. Merusi, C. Corradini, A. Cavazza, C. Borromei, P. Salvadeo, *Food Chem.* 120 (2010) 615-620.
- [41] K. Fukushi, K. Tada, S. Takada, S. Wakida, M. Yamane, K. Higashi, K. Huro, *J. Chromatogr. A* 706 (1995) 303-311.
- [42] M. Jimidar, C. Hartmann, N. Cousement, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 706 (1995) 479-492.
- [43] H. Hirraoka, E. Ishikuro, T. Goto, *Anim. Feed Sci. Technol.* 161 (2010) 58-66.
- [44] A. Padaruskas, V. Olsauskaite, V. Paliulionyte, B. Pranaityte, *Chromatographia* 52 (2002) 133-136.
- [45] A. Okemgbo, H.H. Hill, S.G. Metcalf, M.A. Bachelor, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 387-394.
- [46] T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi, J.-I. Akiyama, *J. Chromatogr.* 271 (1983) D1-D106.
- [47] C. Sarazin, N. Delaunay, A. Varenne, J. Vial, C. Costanza, V. Eudes, J.-J. Minet, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6971-6978.
- [48] J. E. Melanson, N. E. Barylá, C. A. Lucy, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 365-374.

CHAPITRE II – Optimisation multivariée de la réaction de dénitrification alcaline de la nitrocellulose : application à la détermination du taux de nitrification

Multivariate optimization of the denitration reaction of nitrocelluloses for safer determination of their nitrogen content

Forensic Science International, soumis

Elodie Alinat^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{1,3,4}, Xavier Archer², Jérôme Vial^{3,4,5}, Pierre Gareil^{1,3,4*}

¹Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), 75015 Paris, France

³CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France

⁴UPMC, Université Paris 6, 75005 Paris, France

⁵ESPCI ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

Abstract

The nitrogen content is of paramount importance to predict the explosive or non-explosive character of nitrocellulose (NC), and hence its applications. There are still quite a few really effective analytical methodologies allowing its determination, due to great NC molecular complexity. One of the approaches giving access to nitrogen content consists in releasing the nitrogenic moieties through alkaline hydrolysis. For the first time, this work reports on the optimization of the denitration yield by means of an experimental design within reasonable ranges of sodium hydroxide concentration, temperature, and time. The experiments were conducted with non-explosive and explosive NC standards. An original capillary electrophoresis (CE) method was used to monitor nitrite and nitrate ions released during hydrolysis. Because of their very different chemical properties, denitration conditions were optimized separately for both sub-classes of NCs to maximize their denitration yields, applying desirability analysis on modeled denitration yields. Mild, safe, and robust optimized conditions were drawn. The denitration yields (95% for non-explosive NCs, 92 % for explosive NCs) experimentally obtained under these conditions were in good agreement with model predictions. For practical purposes, correction factors based on these maximal denitration yields are proposed for the

first time to correct for the determination of nitrogen content, based on preliminary alkaline denitration. This new strategy was successfully applied to determine nitrogen contents of NCs in real explosive samples (smokeless gunpowders).

Key words: *nitrocellulose, nitrogen content, design of experiments, capillary electrophoresis, sample handling, gunpowders.*

1. Introduction

Nitrocellulose (NC) is a nitrated ester polymer prepared by an esterification reaction between the hydroxyl groups of cellulose with nitric acid in nitric and sulfuric acid mixtures. This results in the replacement of hydroxyl groups of cellulose by nitro groups with a maximum theoretical number of 3 nitro groups per glucopyranose unit, corresponding to a nitrogen content of 14.14% (w/w). In practice, the nitrogen content cannot exceed 13.8%, representing a hydroxyl degree of substitution (DS) of 2.9 per glucose anhydride unit [1]. In fact, the synthesis of NCs having nitrogen content higher than 13.8%, apart from being expensive, led to the formation of unstable compounds such as sulfuric esters of cellulose [2]. Nitrogen content affects physical and chemical NC properties and determines its applications [1]. Indeed, NCs containing less than 12.5% nitrogen are widely used in daily products (printing inks, paints, lacquers, varnishes, filter membranes), whereas NCs having higher nitrogen contents are employed in the manufacturing of energetic materials, such as propellants and dynamites. These are classified according to the number of energetic materials in their composition [3,4]: i) single-base propellants, which contain mainly NC, ii) double-base propellants consisting of NC and nitroglycerin, and iii) triple-base propellants containing NC, nitroglycerin, and nitroguanidine. Smokeless gunpowder formulations also contain other auxiliary compounds such as stabilizers (diphenylamine, ethyl-centralite, and methyl-centralite), flash suppressants, deterrents, plasticizers (dinitrotoluene, dibutylphthalate) and inert material (graphite) [3,4].

While many methods are reported in the literature for the analysis of NC additives [4-11], analysis and characterization of NC itself remain much more challenging, due to its high molar mass, its inherent dispersity in both molar mass and functional groups, its lack of solubility in common organic solvents, and its risk management when handling. Classically employed methods include long and tedious chemical methods such as Devarda's one [12] vibrational spectroscopy [13,14], reversed phase [15], ion [16-19] and size exclusion chromatography [20,21]. Moreover, analysis of NC in formulated explosive products normally requires a proper extraction and purification procedure. Recently, López-López et al. developed a new protocol for the extraction of NC contained in smokeless gunpowders [3]

to determine its nitrogen content after alkaline hydrolysis at 150 °C, using ion chromatography to monitor released nitrite and nitrate ions [18] but no reliable NC standard was used to validate the method. The same group also developed a method for the discrimination of explosive and non-explosive NCs from NC fingerprints obtained by capillary electrophoresis (CE) with laser induced fluorescence detection after derivatization with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate [22], and use of chemometric tools (principal component analysis and soft independent modeling of class analogy) [23]. Unfortunately, no assignment of the fingerprint was proposed.

Apart from being a preliminary step to NC analysis, alkaline hydrolysis has also been used to convert waste NCs from civilian and military industries into non-energetic materials that can be removed by biological processes. This strategy has been the subject of a number of investigations [18, 19, 24-26]. The reaction between NC and strong alkalis is not a simple saponification reaction leading only to the formation of cellulose and nitrate ions. A lot of decomposition products (nitrite, nitrate, ammonia, cyanide, nitrogen oxides, carbon dioxide, acids, sugars, modified cellulose, and partially denitrated NC) are formed [27]. The effects of temperature [25-27], reaction time [17, 18, 25, 27], types and concentrations of bases [17, 18, 25-27] were considered. It was generally observed that the time required to denitrate a given weight of NC decreased with increasing temperature and sodium hydroxide concentration. In no case, nevertheless, the denitration yield has been reported to reach 100%.

In this work, the influence on the alkaline hydrolysis of NCs of sodium hydroxide concentration, temperature, reaction time, and their interactions, was studied using an experimental design within reasonable ranges of these parameters in an attempt to maximize the yield of this first analytical step. To the best of our knowledge, this has never been undertaken before. Because of the very pronounced differences in NC physico-chemical behaviors according to their nitrogen contents, explosive and non-explosive NCs were studied separately. The experiments were conducted with six non-explosive and three explosive NC standards of known nitrogen content and weight-averaged molar mass to investigate the influence of NC characteristics on denitration yields. The possible interfering effect of dinitrotoluene (DNT), diphenylamine (DPA) and centralite on denitration reaction was also considered. For the first time, CE was applied to quantify the nitrite and nitrate ions released after the alkaline hydrolysis of NCs, using a purposely developed method [28]. Desirability functions were employed for finding the conditions leading to maximum denitration yields for non-explosive and explosive NCs, separately. For practical purposes, correction factors based on this maximal denitration yield can be proposed for the determination of nitrogen content, based on preliminary alkaline denitration. The optimized conditions of hydrolysis were next applied to determine the nitrogen content of highly-

nitrated NCs extracted from smokeless gunpowders, applying a correction factor based on this maximum denitration yield.

2. Materials and methods

2.1. Standards and electrolytes

NC standards (Table II-II-1) with a nitrogen content of 11.20 (NC2, NC3), 12.00 (NC4) and 12.20 (NC6) were purchased just at the beginning of this study from Dow Chemical Company (Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Germany). Their manufacturing date was not available. NC standards with a nitrogen content of 11.14 (NC1) and 12.09 (NC5), 12.55 (NC7), and 13.42 (NC8, NC9) were provided by the Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP, Paris, France). At the time of the experiments, they were less than one-year old. NCs were received with ethanol (NC1 to NC6) or water (NC7 to NC9) as damping agent, at a content of approximately 30%.

Table II-II-1: Nitrogen content, substitution degree, and weight-averaged molar masses of the nine studied non-explosive and explosive NC standards.

Identification code	Nitrogen content (%)	Substitution degree	M _w (g/mol)	Damping agent	Explosive (E)/ Non-explosive (NE)
NC1	11.14	2.0	20 000	Ethanol	NE
NC2	11.20	2.0	35 000	Ethanol	NE
NC3	11.20	2.0	137 000	Ethanol	NE
NC4	12.00	2.3	312 000	Ethanol	NE
NC5	12.09	2.3	95 000	Ethanol	NE
NC6	12.20	2.3	29 000	Ethanol	NE
NC7	12.55	2.4	200 000	water	E
NC8	13.42	2.8	69 000	water	E
NC9	13.42	2.8	110 000	water	E

Dinitrotoluenes (2,4-DNT and 2,6-DNT), diphenylamine, and centralite, all of analytical grade, were from Interchim (Montluçon, France). Single-base gunpowders (containing NC, DPA, dibutylphthalate, DNT, potassium sulphate, calcium carbonate, and graphite; the quantitative composition cannot be disclosed) were provided by the Central Laboratory of Police Prefecture. 1 M volumetric solutions (ConvoL Normadose®) of sodium hydroxide used as base for NC hydrolysis were supplied by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium nitrite (> 97%), sodium nitrate (> 99%), sodium molybdate dihydrate (≥ 99.5%) used as internal standard and hexadimethrine bromide (HDMB, > 94%) used as electroosmotic flow (EOF) reversal agent were supplied by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Sodium phosphate monobasic (> 99%) and sodium phosphate dibasic (> 99%) from Sigma were employed for electrolyte preparations. All standard solutions and electrolytes were prepared in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3-UV system (Millipore, Molsheim, France). The preparation of all

stock solutions (nitrite, nitrate, molybdate, phosphate buffer, and ensuing dilutions was described in detail in [28].

2.2. Instrumentation

An oven (model UNB100) from Memmert (Schwabach, Germany) was employed to dry all NC samples. NC hydrolysis experiments were carried out in a block heater (model SBH 130D) from Stuart (Staffordshire, UK) capable of receiving twelve 10-mL glass tubes.

All CE separations were performed on a Beckman Coulter® P/ACE MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with a diode array detector. Data acquisition and instrument control were carried out with 32 Karat® 8.0 software (Beckman Coulter). Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with dimensions of 60 cm (50 cm to the detector) × 50 µm i.d × 365 µm o.d were used for all CE analyses.

2.3. Statistical analysis softwares

Experimental results were analyzed using Excel 2010 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France) and JMP 10.0 (S.A.S Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.4. Alkaline hydrolysis of NC standards

Alkaline denitration assays of NC standards were performed starting from about 40 mg of wetted NC. They were first dried at constant weight, before allowing the denitration reaction to proceed under the selected conditions. At the end of the time, a diluted aliquot of the reactional mixture was analysed for nitrite and nitrate ions by CE. The detailed experimental protocol was described in [28], § 2.4.

2.5. NC hydrolysis in the presence of potentially interfering compounds

Additional assays were realized with the same initial amount of wet explosive NC9 (about 40 mg) in the presence of DNT, centralite, or DPA. NC9 was first dried applying the same protocol as before. Next, about 5 mg of each additive were added into separate tubes containing the dried NC and 5 mL of fixed sodium hydroxide solution were added, as before. The tubes were then heated in the block heater simultaneously with those containing only NC, and hence under the same conditions (temperature, time) as those. The rest of the protocol was identical to that described before.

2.6. Real sample preparation

About 0.2 g of single-base gunpowder was weighed and introduced into a glass beaker. NC was isolated from the sample matrix applying a multistep solvent extraction procedure [3] that we adapted to extract NC from smokeless gunpowders, as outlined in Electronic Supplementary Material, Figure II-II-1S.

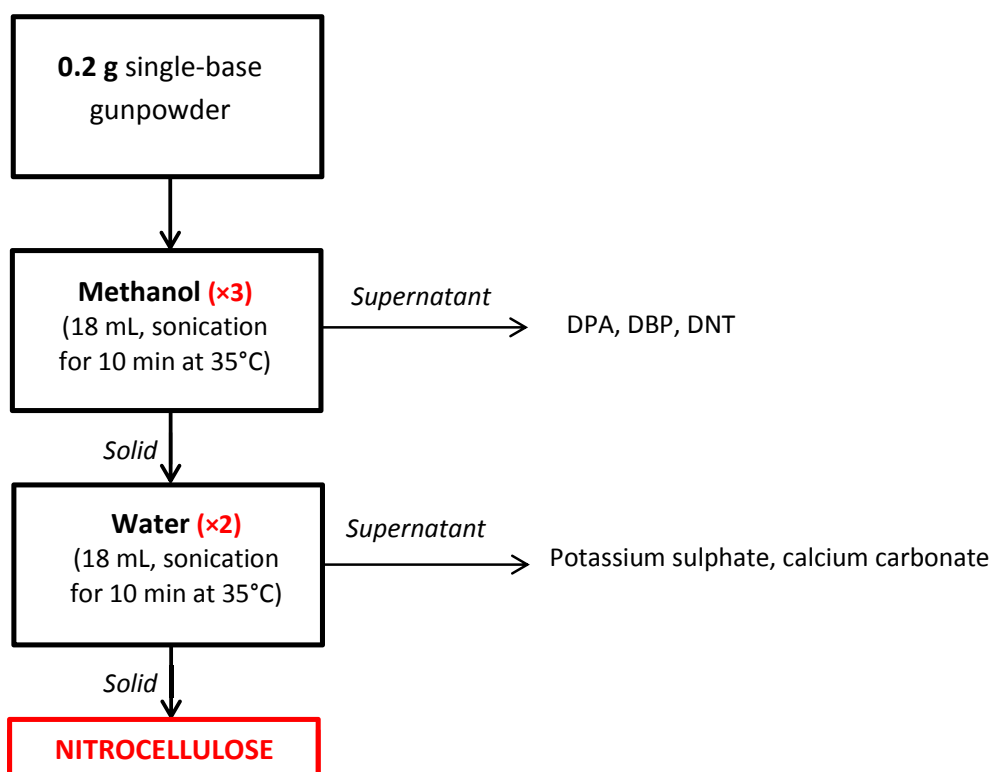


Figure II-II-1S: Diagram summarizing the different steps to extract nitrocellulose from single-base gunpowders composed of nitrocellulose, DNT, DPA, DBP, salts (potassium sulphate, calcium carbonate), and graphite.

Finally, most of the solid NC was recovered after decantation and removing of the supernatant, and introduced into three weighted 10-mL glass tubes. To know the exact amount of NC subjected to alkaline hydrolysis, the solid NC was dried at 100°C for 2 h and the glass tubes were weighed again after the drying step. Next, 5 mL of 1 M sodium hydroxide solution were added into each glass tube containing dry NC and the tubes were screw-capped. The tubes were introduced into the block heater and heated at 60°C for 4 h. After the alkaline hydrolysis step, the tubes were placed in an ice bath for 15 min to quickly cool down the reaction mixture, and thus stop denitration. Then, after 25 min at room temperature, 2500 μL of the hydrolysates were transferred into volumetric flasks of 10 mL containing 200 μL of the internal standard solution at 1000 mg L^{-1} , and supplemented to the mark with ultra-pure water.

2.7. Electrophoresis conditions used to analyze NC hydrolysates

The CE method used for the determination of nitrite and nitrate ions in the alkaline hydrolysates of NCs was described in [28], especially in § 2.3. It was purposely developed to analyse nitrite and nitrate ions in highly alkaline media. The capillary was changed three times during the experimental design (at the end of each block).

2.8. Calculation of denitration yields and nitrogen contents

Quantitation of nitrite and nitrate ions released after NC hydrolysis was carried out using external standardization calibration method with aqueous standard solutions of nitrite and nitrate ions. Molybdate anion was used as internal standard. Detailed procedure was given in [28]. All correlation coefficients obtained for the calibration curves were greater than 0.999. All hydrolysate samples were injected three times. Denitration yields were calculated from nitrite and nitrate concentrations and nitrogen contents given by the manufacturer applying equation (1) given in [28]. Nitrogen contents of NCs in single-base gunpowders were calculated from denitration yields according to equation (2) in [28].

2.9. Safety considerations

NC in dry state is a highly flammable solid that ignites easily and burns explosively when it is concealed. This is why it should always be stored wet. NC can be ignited by flame, heat, shock, friction, sparks or static electricity. Its explosive propensity depends on the nitrogen content. The higher the nitrogen content, the easier it can explode. Special attention was paid to keep NC samples wet when stored in a refrigerator and to weight them after drying in the desiccator to avoid any shock. Security glasses and protection clothes were borne by the operator. In addition, weighing of dry matter was always performed under the assistance of a person equipped with a water vaporizer to prevent from any fire start. Working under less than 30 mg dry matter considerably reduces hazard risks. Indeed, it is worthy of note that no incident occurred over more than four hundred assays that were realized all over this study, respecting these experimental conditions. The oven door opening and closing system was modified to prevent confinement in case of explosion.

3. Experimental design

3.1. Selection of the factors and response

According to literature [17, 18, 24, 27], sodium hydroxide concentration, temperature, and reaction time were selected as factors for this study. The NC concentration in solution was not considered as a parameter in this study and maintained constant at 8 g L^{-1} (40 mg / 5 mL). The selected response was the denitration yields for the nine NC standards, calculated as mentioned in § 2.8.

3.2. Choice of the experimental design

To investigate the effects of the factors on the denitration yields, a central composite design (CCD) was used. For the optimization of the denitration yields, the CCD was composed by combining a two-level full factorial design (2^3 experiments), a star design (2×3 experiments), and central points (coded

0), leading to the realization of 20 experiments. The central point was used to calculate the experimental error and was replicated 6 times. Three orthogonal blocks were chosen to avoid the coefficients of the model being biased for example when changing capillary. The levels of the star design were therefore set at -1.63 and 1.63 [33]. The mathematical relationship between response (denitrification yield) and factors was expressed by the second-order polynomial equation:

$$y(X_{1 \leq i \leq 3}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

where $y(X_{1 \leq i \leq 3})$ was the predicted response, X_i and X_j the coded values of the factors, β_0 was a constant, β_i the linear coefficients, β_{ii} the quadratic coefficients, β_{ij} the interaction coefficients and ε the random error [29]. For each type of NC, the polynomial equation was evaluated by ANOVA in order to determine the significance of the whole model and of each term. The matrix of experiments (see Table II-II-1S in Electronic Supplementary Material) was generated by JMP 10 software.

Table II-II-1S: Matrix of Central Composite Design used in this work.

Block	Experimental order	Factor 1: Temperature	Factor 2: Reaction time	Factor 3: [NaOH]
1	1	0	0	0
	2	1	-1	1
	3	-1	-1	-1
	4	1	1	-1
	5	-1	1	1
	6	0	0	0
2	7	0	0	0
	8	1	1	1
	9	1	-1	-1
	10	-1	-1	1
	11	-1	1	-1
	12	0	0	0
3	13	0	0	0
	14	0	0	-1.6
	15	0	-1.6	0
	16	-1.6	0	0
	17	0	1.6	0
	18	1.6	0	0
	19	0	0	1.6
	20	0	0	0

3.3. Factor ranges and levels

Cautious review of literature and preliminary experimental investigations led to determine the most appropriate factor ranges. Considering reaction time, the maximum value was set at 4 h because longer reaction times did not appear reasonable for routine analysis. To ensure good solubility of

cellulosic backbone at the end of the denitration, a minimum hydrolysis time of 1 h was needed. Temperature was varied between 60°C and 90°C. Indeed, temperatures lower than 60°C led to too long hydrolysis times to reach high denitration yields and the maximum temperature was fixed at 90°C to operate far from the auto-ignition range (160-170°C [30]) and avoid major risks of uncontrolled NC drying. Finally, the maximum sodium hydroxide concentration was fixed at 5 M to minimize perturbations of the denitration reaction by too viscous media and be sure not to encounter matrix effect during CE analysis [28]. The lower value was 1 M to obtain a satisfactory solubilization of the cellulose at the end of the hydrolysis. Finally, the coded and real values of the factors are given in Table II-II-2.

Table II-II-2: Factors and level values used in the experimental design

Coded levels	Temperature (°C)	Reaction time	[NaOH] (M)
-1.6	60.0	1 h 00 min	1.00
-1	65.4	1 h 34 min	1.75
0	75.0	2 h 30 min	3.00
1	84.4	3 h 26 min	4.25
1.6	90.0	4 h 00 min	5.00

4. Results and discussion

4.1. ANOVA and fitting of quadratic model

As the aim of this work was more to identify the importance of the factors, and their interactions, than to really use the mathematical relationship to calculate the denitration yields in practical situations, a significance probability of 0.1 was chosen to help drawing more general conclusions. The ANOVA of regression is given in Table II-II-3.

Table II-II-3: ANOVA for the regression of denitration yields of the nine studied non-explosive and explosive NC standards.

NC	F-value	P-value	R ²
NC1	3.66	0.0380	0.83
NC2	1.66	0.2412	0.70
NC3	3.05	0.0622	0.81
NC4	1.95	0.1754	0.73
NC5	1.54	0.2772	0.68
NC6	1.77	0.2144	0.71
NC7	1.75	0.2182	0.71
NC8	15.39	0.0003	0.95
NC9	4.50	0.0210	0.86

The model appears significant for two non-explosive (NC1 and NC3), and two explosive (NC8 and NC9) NCs. The quality of the model can be verified by the determination coefficient R^2 , ranging from 0.81 to 0.95 for these four NCs. The correlation plot between experimental and predicted values of denitration yields is given for NC8, in Electronic Supplementary Material (Figure II-II-2S), highlighting the relevance of the model.

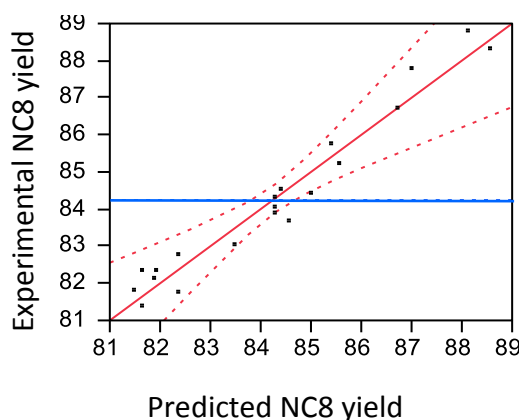


Figure II-II-2S: Correlation plot between the values for the denitration yields predicted by the model and the experimental values for nitrocellulose standard NC8. Red dashed lines represents the 95% confidence curves and the horizontal blue line the mean of experimental values.

For the other NC standards, the regression model did not account for the relationship between the factors and the responses so satisfactorily, as P-values were between 0.17 and 0.27 and R^2 values between 0.68 and 0.73 (Table II-II-3). This should be explained in part by the small variation ranges of the responses, in part by the relatively high dispersion observed at the central point. For example in the studied domain, the obtained denitration yields for NC6 ranged from 81 to 88% only. The special case of NC7 standard will be further discussed later in this paper. As both explosive and non-explosive NCs were properly modeled, the quality of the model does not seem to be related to either the nitrogen content or the molar mass of the NC.

4.2. Effects of factors on denitration yields of weakly- and highly nitrated NCs

To identify the influential factors in the denitration yield, the second-order polynomial model presented in equation (1) was used. The values of the model coefficients (β_i , β_{ii} , and β_{ij}) were estimated by multiple regression analysis of the experimental data using regression coefficients. Student's t-test was then performed to evaluate the coefficient significance by comparing the coefficient estimate with its standard-deviation (calculated from the regression residuals). A factor or an interaction was considered as statistically significant with a first kind risk set at 10% if the calculated value of the t-ratio (coefficient normalized by its standard deviation) was out of the ± 1.9 range. The histograms

presented in Figure II-II-1 illustrate the influence of the factors and their interactions for non-explosive NC1 and explosive NC8.

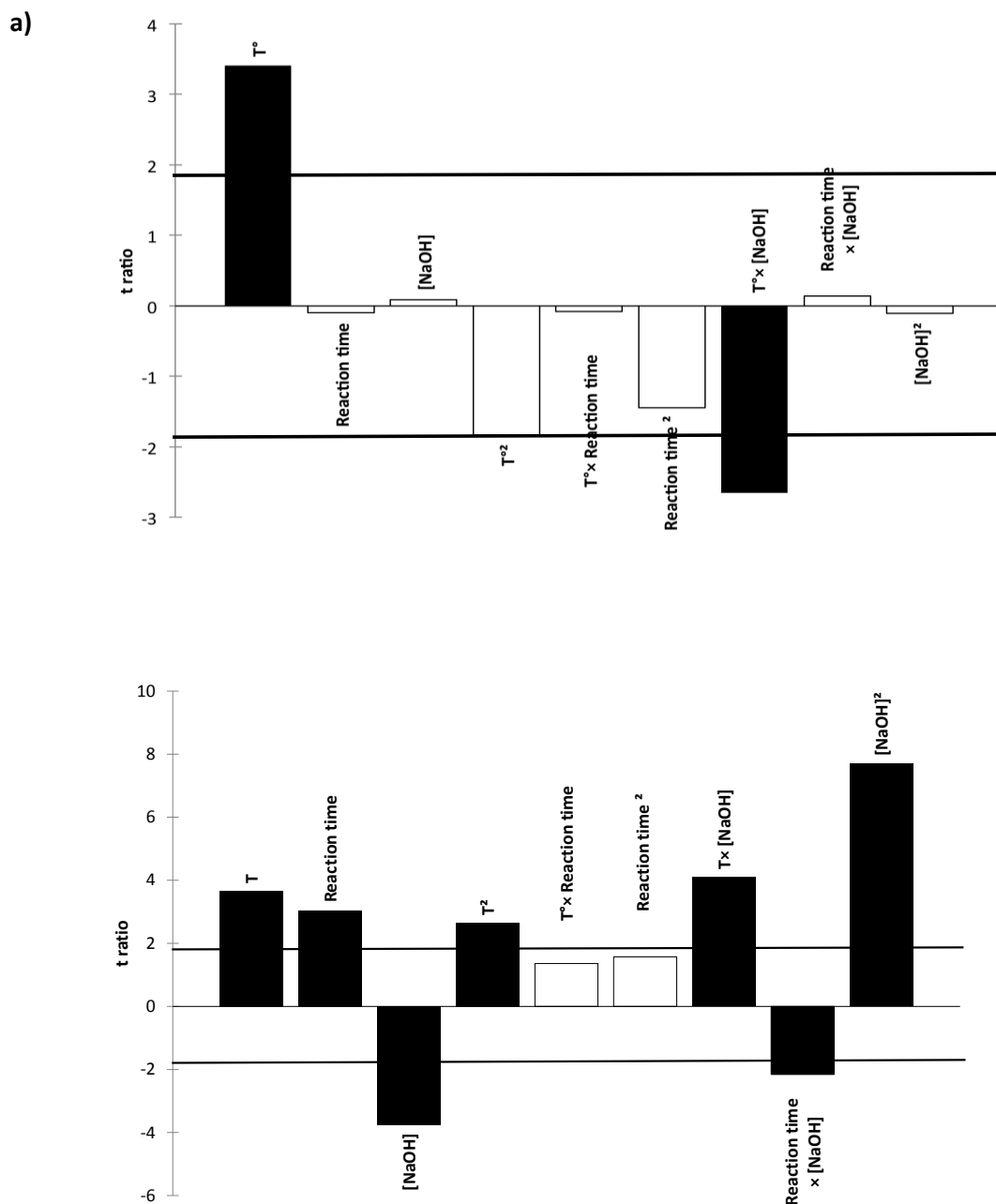
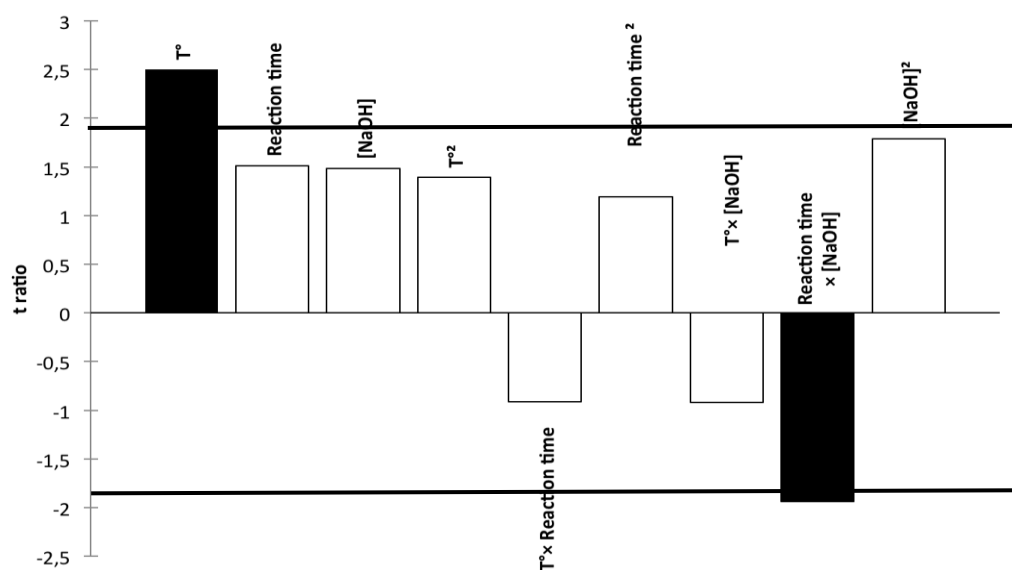


Figure II-II-1: Representation of the effects of temperature, reaction time, and NaOH concentration on denitration yield of (a) non-explosive NC1 and (b) explosive NC8 with a first kind risk at 10%. Influent factors appear in black. t-ratio is the factor coefficient normalized by its standard-deviation.

Results for NC3 and NC9 are given in Electronic Supplementary Material (Figure II-II-3S).

a)



b)

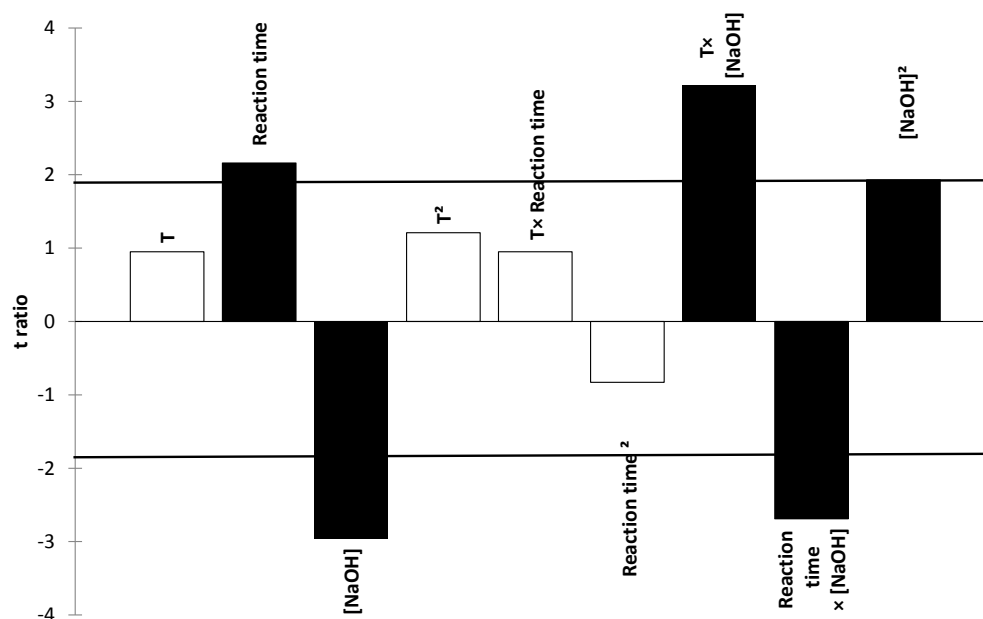


Figure II-II-3S. Representation of the effects of temperature, reaction time, and NaOH concentration on denitration yield of (a) non-explosive NC3 and (b) explosive NC9 with a first kind risk at 10%. Influent factors appear in black. t-ratio is the factor coefficient normalized by its standard-deviation.

The amplitude of each effect is represented by the horizontal bars and the horizontal line corresponds to the 1.9 level, which informs on how much the effect is statistically significant. Positive / negative values of a factor coefficient indicate positive / negative effects, respectively, of this factor on the yield.

For non-explosive NCs (NC1 and NC3), temperature was the single significant parameter (positive effect) on denitration yield. Quadratic terms were never significant. Some first-order interactions between parameters exhibited coefficients that are similar to those of linear terms. Especially, the $T \times [\text{NaOH}]$ term appeared significant for NC1, while the reaction time $\times [\text{NaOH}]$ term appeared significant for NC3. For explosive NCs (NC8, NC9), sodium hydroxide concentration appears as the most influent parameter, with a positive quadratic effect and a negative linear effect. Temperature and reaction time also significantly influence the denitration process (NC8). The quadratic term T^2 also outpasses the threshold of significance for NC8, justifying the choice of second-order polynomial quadratic modeling for the yield. The temperature $\times [\text{NaOH}]$ term (positive effect), and reaction time $\times [\text{NaOH}]$ term (negative effect) are significant interactions for both NC8 and NC9, underlying the combined effect of these factors. Taking into account that some of the t ratio values are not much higher than the threshold value of 1.9 (which should be due to the limited variation range of the denitration yields), it can be considered that explosive NC8 and NC9 standards do not behave differently, as compared to the behavior of non-explosive NC1 and NC3.

These comparisons lend support to a clear difference between the denitration mechanism of highly- and lowly nitrated NCs.

4.3. Optimization

Optimization of the factors to reach maximal denitration yields was carried out by using a desirability function. Desirability values were set at 0 and 1 for denitration yields of 80% and 100%, respectively, as shown graphically in the last column of Figure II-II-2.

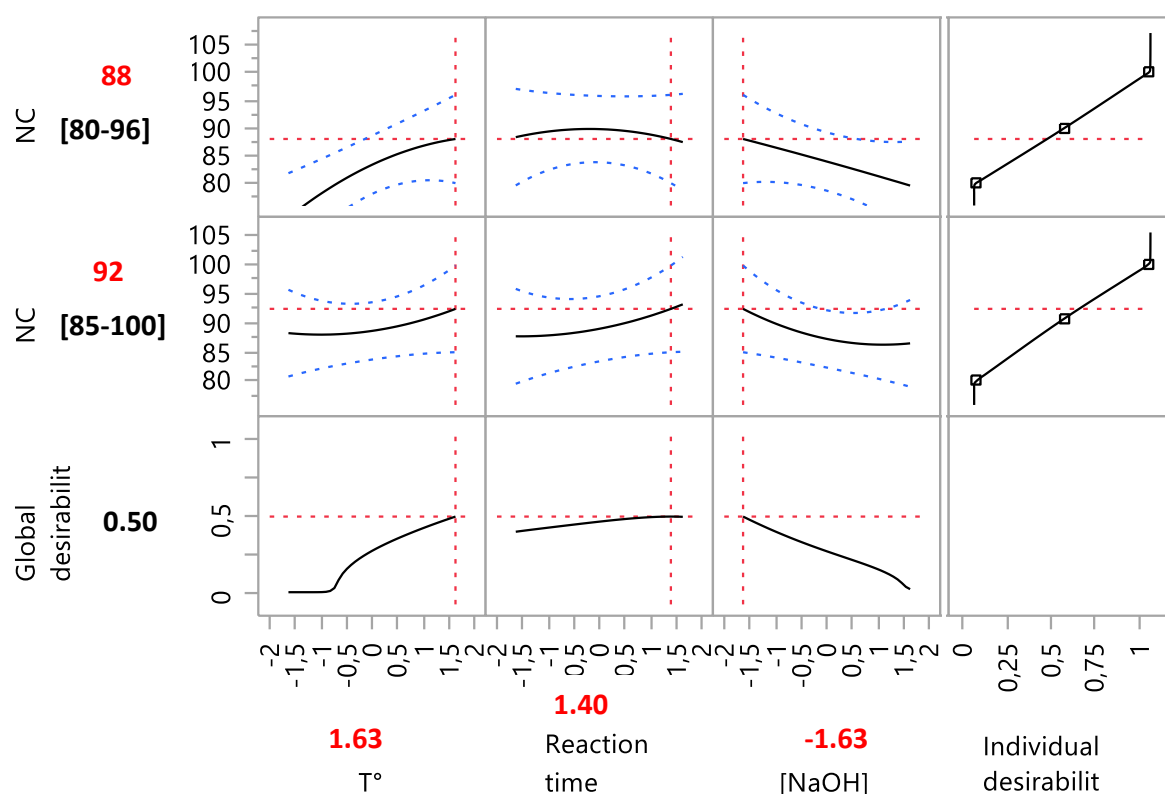


Figure II-II-2: Variations of the denitrification yields for NC1 and NC3 as a function of temperature, reaction time, and [NaOH] predicted by the modeled responses, using prediction profiler of JMP software. The two responses of interest correspond to the first two rows. The last row indicates the global desirability as a function of the three studied factors represented at optimum coded values in the first three columns. The last column represents the individual desirability values for each yield. Values appearing under the name of the responses and under the global desirability are the ones predicted by the model at optimum conditions \pm the corresponding 95% confidence interval.

For non-explosive NC1 and NC3, the conditions for optimum denitrification yields predicted by the model were in coded values: -1.63 for [NaOH], 1.63 for temperature, and 1.40 for reaction time (see Figure II-II-2) corresponding to denitrification conditions of 1 M NaOH, 90°C, and 3 h 45 min reaction time. These conditions lead to predicted yields of 88% for NC1 and 92% for NC3. For explosive NC8 and NC9, the same conditions for optimum denitrification yield were obtained at (coded values) -1.63 for [NaOH], -1.63 for temperature, and 1.63 for reaction time (see Electronic Supplementary Material, Figure II-II-4S), corresponding to denitrification conditions of 1 M NaOH, 60°C, and 4 h reaction time. The predicted yields were 95% for both NC8 and NC9.

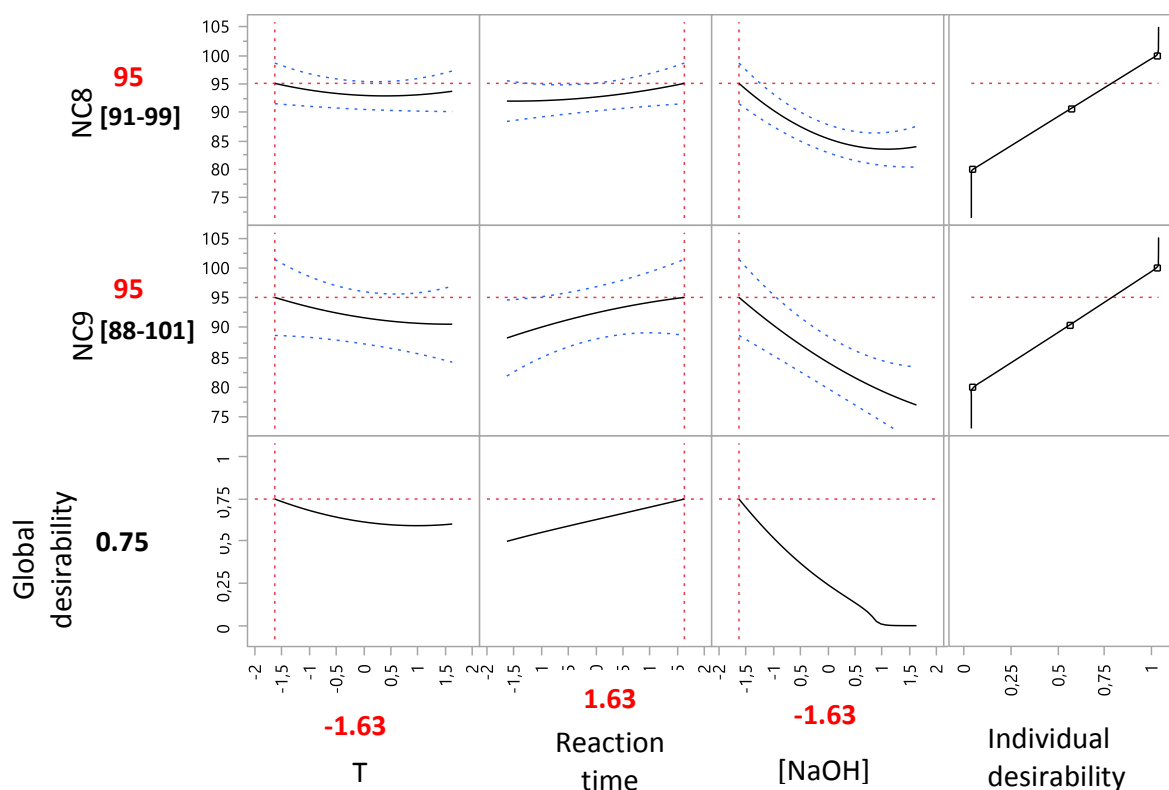


Figure II-II-4S: Variations of the denitration yields for NC8 and NC9 as a function of temperature, reaction time, and [NaOH] predicted by the modeled responses, using prediction profiler of JMP software. The two responses of interest correspond to the first two rows. The last row indicates the global desirability as a function of the three studied factors represented at optimum coded values in the first three columns. The last column represents the individual desirability values for each yield. Values appearing under the name of the responses and under the global desirability are the ones predicted by the model at optimum conditions \pm the corresponding 95% confidence interval.

Contour (2D) and three dimensional (3D) plots for the predicted yields were estimated using the model polynomial functions to represent the evolutions of the response as shown in Figure II-II-3 for explosive NC8 and NC9.

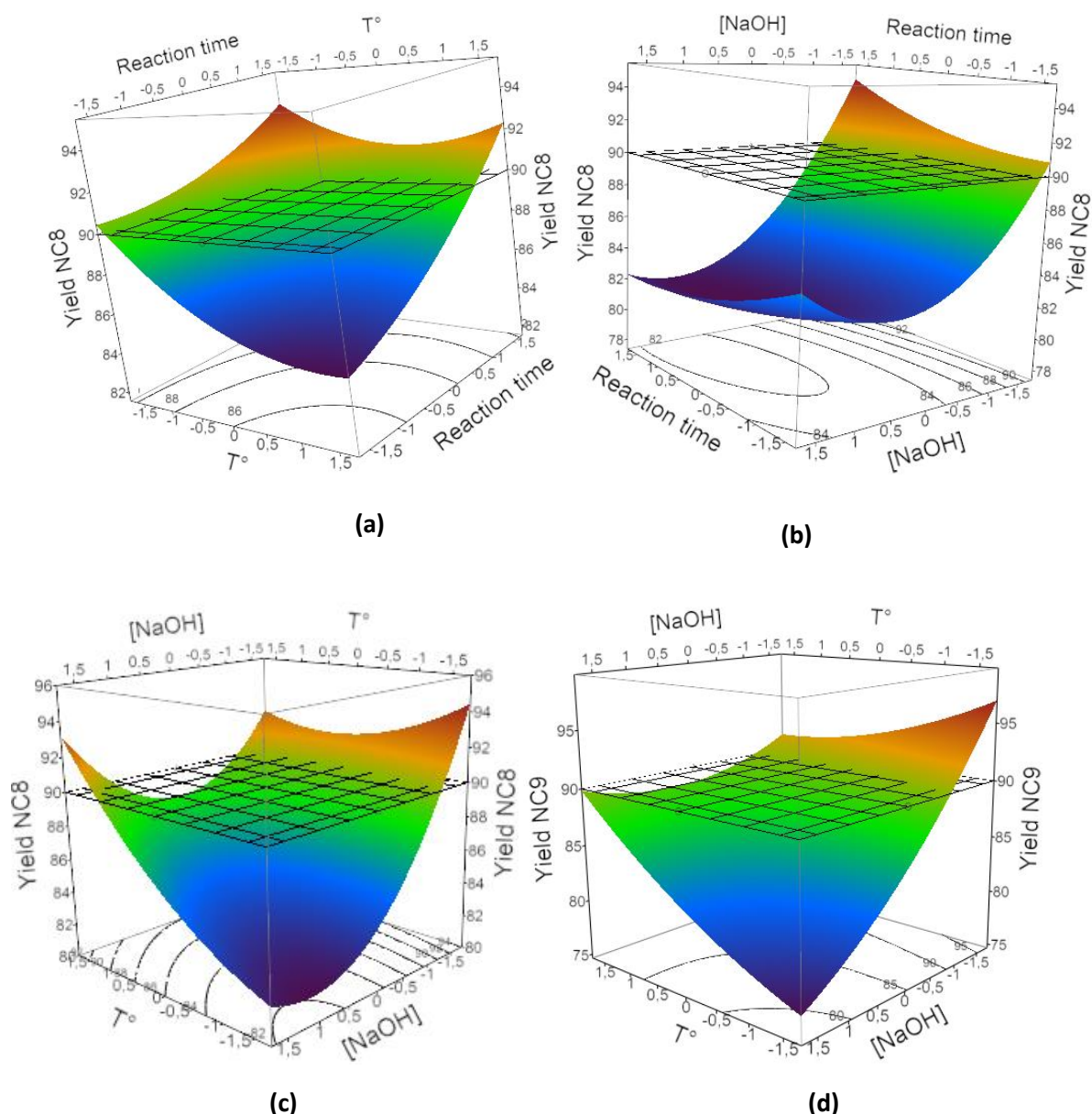
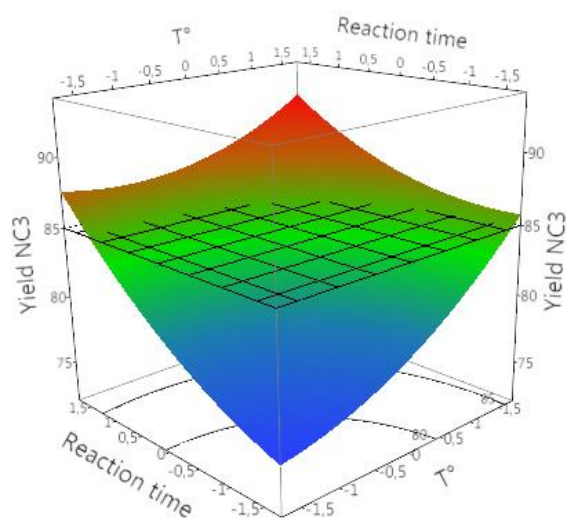


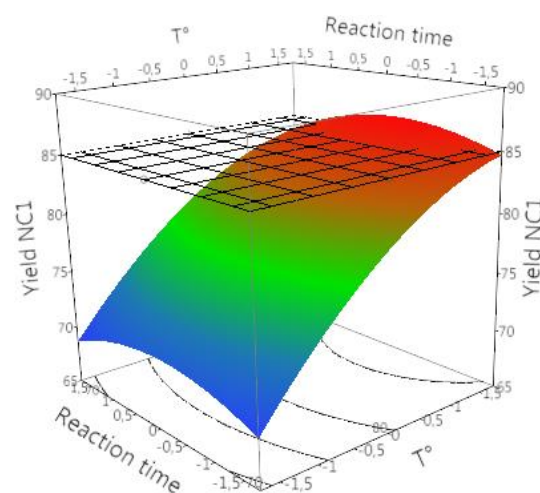
Figure II-II-3: Response surface plots of (a) yield for NC8 as a function of temperature and reaction time with [NaOH] fixed at -1.63 (1 M), (b) yield for NC8 as a function of [NaOH] and reaction time with temperature fixed at -1.63 (60°C), (c) yield for NC8 as a function of temperature and [NaOH] with reaction time fixed at 1.63 (4 h), and (d) yield for NC9 as a function of temperature and [NaOH] with reaction time fixed at 1.63 (4 h). Contour plots below response surface plots represent the isoresponse lines.

Similar plots are given in Electronic Supplementary Material Figure II-II-5S for non-explosive NC1 and NC3. For all the plots, the domain located below the grid corresponds to the experimental domain for which denitration yield was lower than 90%. Since the model has three factors, one factor was held constant at its optimum value for each representation. Figure II-II-3a, b, c depict the 3D plot and its corresponding contour plot, representing the yields for NC8 versus the three significant factors ([NaOH], reaction time, and temperature). Figure II-II-3d shows the effect of [NaOH] on the yield for

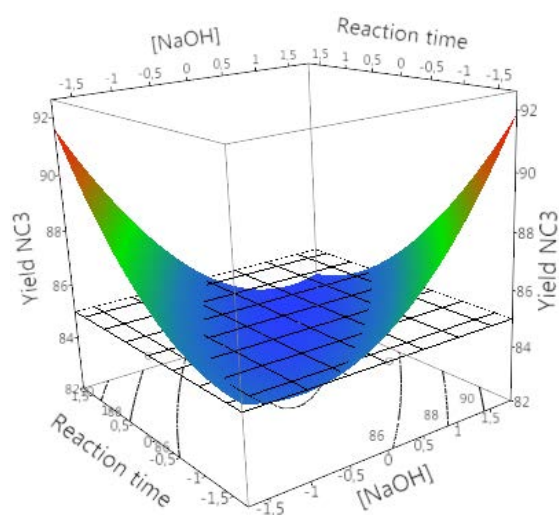
NC9 at varying temperature for a 4 h-reaction time, highlighting the similar behavior presented by NC8 and NC9.



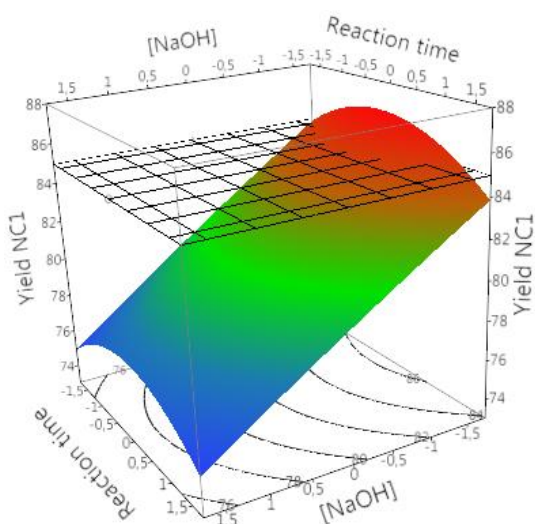
(a)



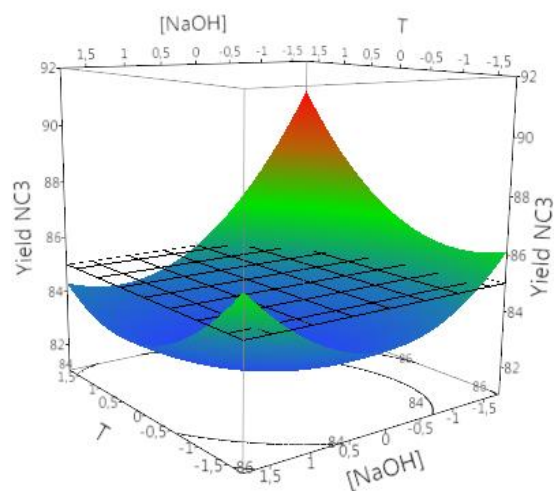
(b)



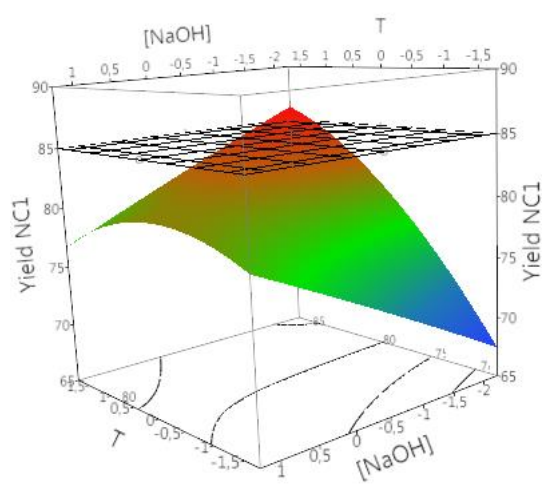
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure II-II-5S. Response plots of yields for NC3 (a) and NC1 (b) as a function of reaction time and temperature with [NaOH] fixed at -1.63 (1 M); yields for NC3 (c) and NC1 (d) as a function of reaction time and [NaOH] with temperature fixed at 1.63 (90°C); yields for NC3 (e) and NC1 (f) as a function of temperature and [NaOH] with reaction time fixed at 1.40 (3 h 45). Contour plots below response plots represent the isoresponse lines.

4.4. Experimental validation and robustness study

To experimentally check the optimum conditions predicted by the model, repeated hydrolyses of both non-explosive and explosive NC standards were carried out under their respective optimum denitration conditions (1 M sodium hydroxide solution for 3 h 45 min at 90°C for non-explosive NCs; 1 M sodium hydroxide solution for 4 h at 60 °C for explosive NCs). A typical resulting electropherogram obtained for NC6 is shown in Figure II-II-4.

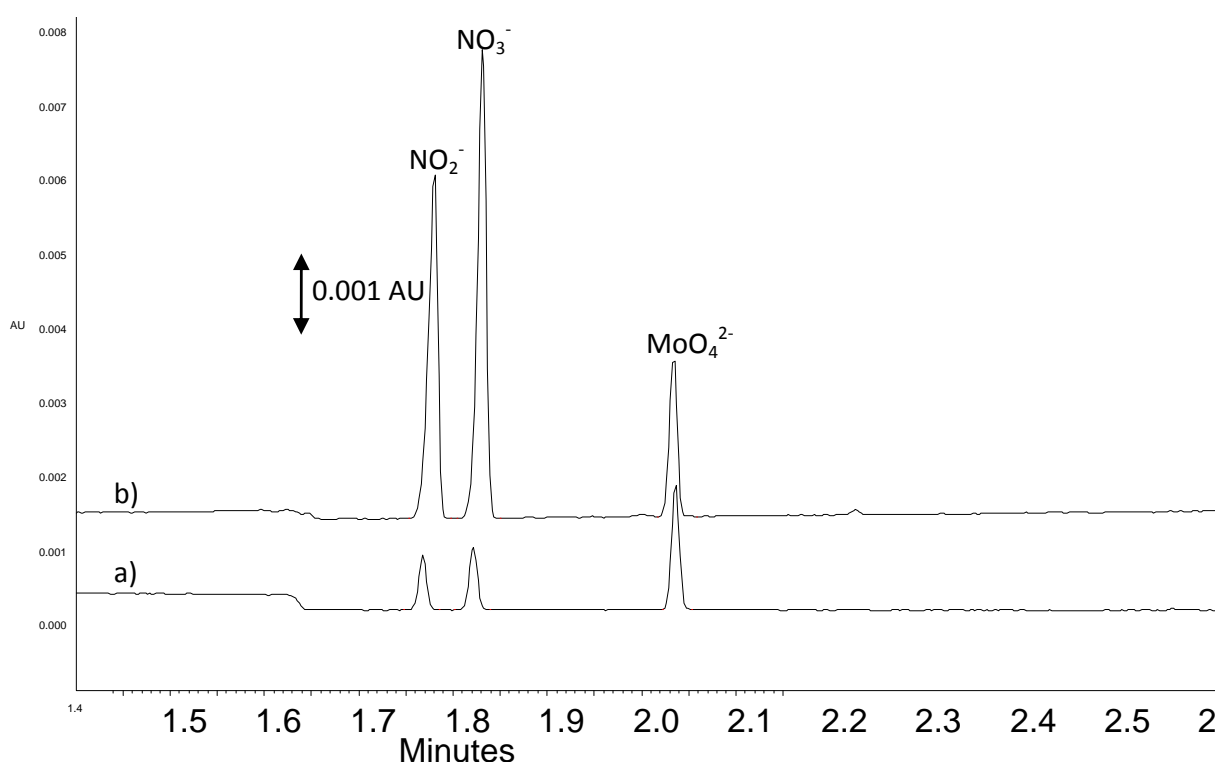


Figure II-II-4: Electropherograms of (a) a standard mixture of nitrite, nitrate, and molybdate ions at 5 mg mL⁻¹ in water spiked with MoO_4^{2-} at 20 mg mL⁻¹, and (b) an alkaline hydrolysate of NC6 spiked with MoO_4^{2-} at 20 mg mL⁻¹ and diluted 40 times with water. Hydrolysis conditions: 1 M NaOH for 3 h 45 min at 90°C. CE conditions: bare-fused silica capillary, 50 μm ID \times 60 cm (detection at 50 cm); EOF reversal with 1 g L⁻¹ Hexadimethrine bromide; background electrolyte: 100 mM ionic strength sodium phosphate, pH 7.7; temperature: 25°C; applied voltage: -30 kV; hydrodynamic injection, 0.5 psi, 3 s; detection: UV at 210 nm.

The results given in Table II-II-4 shows that for non-explosive NCs, homogeneous experimental denitrations yields between 93 and 96% (with RSDs between 1 and 3%) were obtained, higher than, but in good agreement with the predicted values for NC1 (88 \pm 8%) and NC3 (92 \pm 7%). For explosive

NC8 and NC9 (Table II-II-4), experimental denitration yields (91 and 92%, respectively, with 2 % RDS) were lower than, but still in agreement with the predicted values of $95 \pm 5\%$.

Table II-II-4: Denitration yields obtained for the six non-explosive and three explosive NC standards under their respective optimum conditions.

NC	Predicted denitration yield (%)	Experimental denitration yield (%)	Experimental RSDs (%) (n=3)
Non-explosive NCs			n = 3
Optimum conditions: 1 M NaOH at 90 °C for 3 h 45 min			
1	88	94	2
2	-	94	1
3	92	93	1
4	-	96	3
5	-	96	1
6	-	94	1
Explosive NCs			n = 10
Optimum conditions: 1 M NaOH at 60 °C for 4 h			
7	-	86	1
8	95	91	2
9	95	92	2

All these results demonstrate that the obtained denitration yields were very close within each sub-class of explosive or non-explosive NC, whatever the nitrogen content and the molar mass of the NC. An exception to this might be NC7, the obtained denitration yield of which was 86% (with RSDs equal to 1%), which was much lower than those obtained for NC8 and NC9. This outlier might be attributed to a particular denitration process of this NC standard over time [18] or storage conditions [31]

The robustness of the hydrolysis protocol around the optimized conditions was performed by evaluating the effect of small controlled factor variations (about ± 5 to 7%) on the denitration yield. In this study, the domains representing these variations were determined in real values between 0.95 and 1.05 M for [NaOH], between 85 and 95°C (non-explosive NCs) or 55 and 65 °C (explosive NCs) for temperature, and between 3 h 30 min and 4 h 00 min (non-explosive NCs) or 3 h 45 min and 4 h 15 min (explosive NCs) for reaction time. Detailed results are given in Electronic Supplementary Material, Table II-II-2S.

Table II-II-2S: Denitration yields obtained for non-explosive (NC1 to NC6) and explosive (NC8 and NC9) nitrocelluloses under alkaline hydrolysis conditions close to the optimum conditions (1 M NaOH at 90°C for 3 h 45 min for non-explosive NCs; 1 M NaOH at 60 °C for 4 h for explosive NCs) for robustness evaluation. NC7 was not studied at this stage because of its previously observed odd behavior.

NC	Temperature (°C)	[NaOH] (M)	Reaction time (min)	Yield (%)
1	85	1.05	210	95
	85	0.95	240	96
	95	0.95	210	94
	95	1.05	240	95
2	85	1.05	210	94
	85	0.95	240	94
	95	0.95	210	92
	95	1.05	240	95
3	85	1.05	210	92
	85	0.95	240	92
	95	0.95	210	93
	95	1.05	240	92
4	85	1.05	210	95
	85	0.95	240	93
	95	0.95	210	95
	95	1.05	240	93
5	85	1.05	210	97
	85	0.95	240	94
	95	0.95	210	94
	95	1.05	240	97
6	85	1.05	210	95
	85	0.95	240	93
	95	0.95	210	94
	95	1.05	240	94
8	55	1.05	225	90
	55	0.95	255	94
	65	0.95	225	93
	65	1.05	255	94
9	55	1.05	225	90
	55	0.95	255	92
	65	0.95	225	93
	65	1.05	255	94

They show the hydrolysis protocol is robust for both sub-classes of NCs, since the applied changes to the factors do not produce any significant effect on the denitration yields.

4.5. Study of potentially interfering additives

DNT, DPA, and phenylureas (centralite, ethyl centralite) are commonly used among other compounds as additives in NC-based gunpowders. They are generally considered as interfering compounds in most analytical protocols aiming at determining NC nitrogen content [18]. According to

Hill et al. [32], DNT is more resistant to alkaline hydrolysis than trinitrotoluene (TNT) but TNT is not present in smokeless gunpowder formulation. Besides, it is well known that DPA stabilizes smokeless gunpowders by binding nitrogen oxide gases (NO, NO₂) released by NC during the decomposition process, leading to the formation of nitrated DPA derivatives. The interfering influence of phenylurea derivatives is not documented. This is why tedious multistep solvent extractions are performed on NC formulations to eliminate them [3]. Nevertheless, small amounts of these compounds may remain in the isolated NCs. For this work, 2,4-DNT, DPA, and centralite were chosen as representatives of the nitroaromatic and phenylurea classes of compounds, respectively. To study the effects of these compounds on the denitration yields, binary mixtures of NC9 and each of these three additives were prepared in proportions corresponding to those used in current NC formulations, and hydrolyses of these mixtures were carried out in triplicate in the optimized conditions for explosive NCs. Then, the average denitration yields obtained with and without each additive were compared statistically, using a bilateral Student's t-test with a first kind risk set at 5%. For all three additives, the calculated t-values were lower than the tabulated t-value, indicating that the two averages were not significantly different. This suggests that the long multistep sample treatment may not be necessary, or perhaps simplified, at least for single-based NCs, if the NC content of the sample is known (so that it can be used in the calculations). Nevertheless, in all other cases, in order to determine its nitrogen content, NC should be purified before to be weighed, to discard any bias.

4.6. Application to the determination of the nitrogen content of NC contained in smokeless gunpowders

The conditions for alkaline denitration optimized for explosive NCs were applied to the determination of nitrogen contents in single-based gunpowders. NC was extracted using the protocol described before, dried at constant weight, and weighed. It is to be noted that knowledge of the extraction yield is not required, but extracted NC has to be considered as pure. Equation (2) of [28] (see also § 2.8) was used with the concentrations of released nitrite and nitrate ions determined by CE and a value for denitration yield of 92%. The obtained experimental values for the nitrogen contents of NC from single-base gunpowders are given in Table II-II-5.

Table II-II-5: Nitrogen content of nitrocellulose extracted from single-base gunpowders, obtained after alkaline hydrolysis, and determination of released nitrite and nitrate ions by CE. Hydrolysis conditions: 1 M [NaOH] for 4 h at 60°C.

Sample	Experimental data		Manufacturer's data Nitrogen content (%)
	Nitrogen content (%)	RSD (%) (n=3)	
Gunpowder 1	13.1 ± 0.03	0.2	13.2 ± 0.05
Gunpowder 2	13.6 ± 0.06	0.4	13.2 ± 0.05

The mean values of nitrogen content of NC obtained from three independent extractions are 13.1% (RSD, 0.2%) and 13.6% (RSD, 0.3%) for gunpowder 1 and gunpowder 2, respectively. These results are in close agreement with the data given by the manufacturer (determined by Devarda's method), showing the accuracy of the new optimized method for the determination of the nitrogen content of NCs in smokeless gunpowder. In addition, precisions are very similar to, if not better than, those provided by Devarda's method. For NC extracted from gunpowder 1, the obtained nitrogen content is slightly lower than those given by the manufacturer. This might be due to slight denitration of NC during aging [18].

4.7. Correlation between nitrite to nitrate ion ratio and nitrogen content

According to the literature, the molar ratio of nitrite to nitrate ions found in the post-hydrolysis solutions of NC should be close to 3, regardless of NC nitrogen content [25, 27]. The molar ratios of nitrite to nitrate ion obtained over all the alkaline hydrolyses performed under experimental design with the six non-explosives and the three explosive NC standards were systematically calculated and examined. It appears that this ratio can be noticeably different from 3, varying between approximately 1.2 and 3.2. Moreover, and much more interestingly, the values obtained depend only slightly on the hydrolysis conditions (sodium hydroxide concentration, temperature, and reaction time), but, unexpectedly, some correlation between the nitrogen content of NC and the molar ratio of nitrite to nitrate ions clearly appears. For the sake of an example, the plot of the molar ratio of nitrite to nitrate ions versus the nitrogen content of NC for hydrolysis at 75°C for 2 h 30 min with sodium hydroxide at 3 M (central point of CCD) is shown in Figure II-II-5.

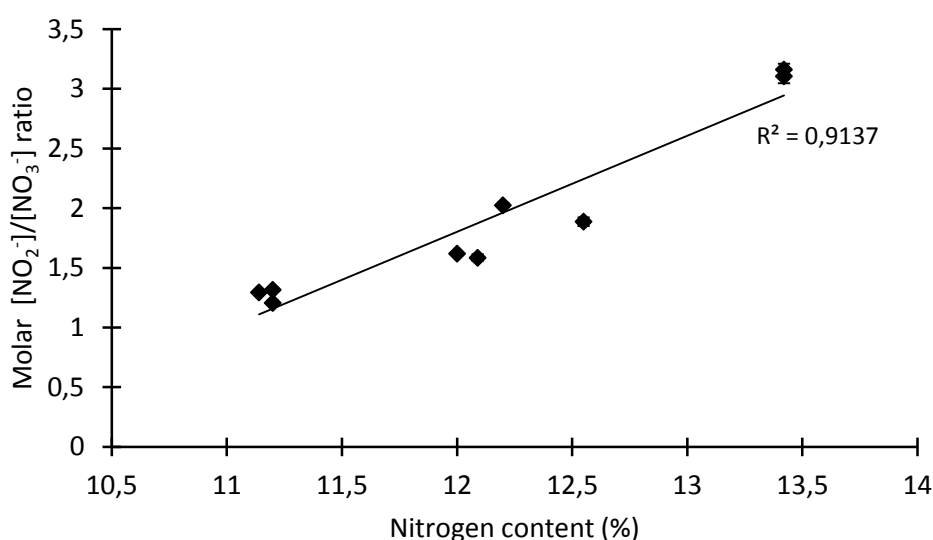


Figure II-II-5 Representation of the molar ratio of nitrite to nitrate ions versus the nitrogen content of non-explosive and explosive NC standards (NC1 to NC9). Alkaline hydrolysis conditions: 3 M sodium hydroxide at 75°C for 2 h 30 min (central point of the CCD). Error bars representing \pm one standard deviation ($n = 6$) are partly hidden by the symbol size.

It is worthy of note that the experimental point corresponding to NC7 (manufacturer's nitrogen content, 12.55%) is the farthest one from the regression line. For highly-nitrated NCs contained in smokeless gunpowder, a ratio close to 3 was actually obtained, whereas for weakly-nitrated NCs the ratio was always less than 2.5. Two possible denitration pathways explaining the release of nitrite and nitrate ions were suggested [33] but the proposed pathways do not allow one to specify the value of this ratio. Currently, the exact mechanism of denitration is not known. The results of this study lend support to consider the denitration pathway is probably different according to the DS of NC. For highly-nitrated NCs, the nitrite-producing mechanism should be favored. Additional work is underway in our group to clarify this mechanism. Eventually, this finding might become a new simple criterium to discriminate NCs according to their nitrogen contents.

5. Conclusions

For the first time, a design of experiment was used in an attempt to optimize the conditions for alkaline hydrolysis of explosive and non-explosive NCs in view of determining their nitrogen contents. The use of a CCD was found effective to clarify the effects of temperature, sodium hydroxide concentration, and reaction time, and, with the help of a desirability analysis, find out optimal conditions for denitration. Because of differences in chemical properties of NCs according to their nitrogen contents, use of the same denitration conditions to precisely determine the nitrogen content of all NCs is not advocated. For non-explosive NCs, mean denitration yields of 95% were obtained with 1 M sodium hydroxide at 90°C for 3 h 45 min, with quite satisfactory RSDs for the whole analytical process ($n = 3$) of ca 2%. For explosive NCs, most importantly, the highest denitration yields in the experienced field were obtained under mild and safe conditions (1 M sodium hydroxide at 60°C for 4 h) affording denitration yields of 92% (RSDs on the whole analytical process ($n = 10$) of ca 2%). Moreover, formulation additives such as DNT, DPA, and centralite do not significantly alter the denitration yield of explosive NCs. Unfortunately, total denitration was never reached in any conditions (confirming literature), because of incomplete NC denitration and the formation of other nitrogen-containing products through competitive reactions. For each sub-class of NCs, however, the obtained denitration yields were robust and very close to each other, whatever the nitrogen content and the molar mass. It is therefore possible to introduce a fixed correction factor ($1/0.95 = 1.053$ for non-explosive NCs; $1/0.92 = 1.087$ for explosive NCs) in the determination of nitrogen content after alkaline hydrolysis, to account for actual yields. To our knowledge, this is not a current practice, as quantitative denitration is currently assumed [18]. Finally, this study also shows for the first time some correlation

between the molar ratio of nitrite to nitrate ions and NC nitrogen content. Work is in progress to elucidate the mechanism behind, and assess the practical interest of this finding.

References

- [1] M. A. Fernández de la Ossa, M. López-López, M. Torre and C. García-Ruiz, Analytical techniques in the study of highly-nitrated nitrocelluloses, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1740-1755.
- [2] C. W. Saunders and, L. T. Taylor, A review of the synthesis chemistry and analysis of nitrocellulose, *J. Energ. Mater.* 8 (1990) 149-201.
- [3] M. López- López, M. A. Fernandez de la Ossa, J. Saiz Galindo, J. L. Ferrando, A. Vega, M. Torre , C. García-Ruiz, New protocol for the isolation of nitrocellulose from gunpowders: Utility in their identification, *Talanta* 81 (2010) 1742-1749.
- [4] M. López-López, J. Carlos Bravo, C. García-Ruiz and M. Torre, Diphenylamine and derivatives as predictors of gunpowder age by means of HPLC and statistical models, *Talanta* 103 (2013) 214-220.
- [5] C. West, G. Baron and J. J. Minet, Detection of gunpowder stabilizers with ion mobility spectrometry, *Forensic Sci. Int.*, 166 (2007) 91-101.
- [6] C. Perre, I. Cordin, M. Blas and B. R. McCord, Separation and identification of smokeless gunpowder additives by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 259-265.
- [7] C. M. Mahoney, G. Gillen and A. J. Fahey, Characterization of gunpowder samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), *Forensic Sci. Int.*, 158 (2006) 39-51.
- [8] O. Cascio, M. Trettene, F. Bortolotti, G. Milana and F. Tagliaro, Analysis of organic components of smokeless gunpowders: High-performance liquid chromatography vs. micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis* 25 (2004) 1543-1547.
- [9] D. Laza, B. Nys, J. De Kinder, A. Kirsch-De Mesmaeker and C. Moucheron, Development of a Quantitative LC-MS/MS Method for the Analysis of Common Propellant Powder Stabilizers in Gunshot Residue, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 842-850.
- [10] J. L. Thomas, D. Lincoln and B. R. McCord, Separation and Detection of Smokeless Powder Additives by Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS), *J. Forensic Sci.* 58 (2013) 609-615.
- [11] D. M. Northrop, D. E. Martire and W. A. MacCrehan, Separation and identification of organic gunshot and explosive constituents by micellar electrokinetic capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1038-1042.
- [12] Taux d'azote nitrique des nitrocelluloses (méthode de Devarda), GEMO FN-102-A-1, 1989.
- [13] D. Dolinak, S. H. Wise and C. Jones, Microscopic and spectroscopic features of gunpowders and its documentation in gunshot wounds in charred bodies, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 29 (2008) 312-319.
- [14] D. S. Moore and S. D. McGrane, Comparative infrared and Raman spectroscopy of energetic polymers, *J. Mol. Struct.* 661 (2003) 561-566.
- [15] M. T. Combs, Methodology for determination of nitrogen content in nitrocellulose, United States Patent WO2013006218 A1.
- [16] D. Crokek and B. Dankowski, Sonolysis of nitrocellulose fines, US Army Corps of Engineers, Engineer Research and Development Center, Technical report ERDC/CERL TR-00-14, May 2000.
- [17] D. K. MacMillan, C. R. Majerus, R. D. Laubscher, and J. P. Shannon, A reproducible method for the determination of nitrocellulose in soil, *Talanta* 74 (2008) 1026-1031.
- [18] M. López- López, J. M. Ramiro Alegre, C. García-Ruiz and M. Torre, Determination of the nitrogen content of nitrocellulose from smokeless gunpowders and collodions by alkaline hydrolysis and ion chromatography, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 196-203.
- [19] D. L. Freedman, J. M. Cashwell and B. J. Kim, Biotransformation of explosive-grade nitrocellulose under denitrifying and sulfidogenic conditions, *Waste Manage.* 22 (2002) 283-292.
- [20] P. Deacon, A. Macdonald, P. Gill, N. Mai, M. A. Bohr, H. Pontius, M. Hust, W. Klerk and C. Bater, A new, internationally accepted standard for testing nitrocellulose, STANAG 4178 (ED2), 2009.
- [21] M. Marx-Figini and O. Soubelet, Size exclusion chromatography (GPC) of cellulose nitrate using nitrate using modified silicagel as stationary phase, *Polym. Bull.* 6 (1982) 501-508.

- [22] M. A. Fernández de la Ossa, M. Torre and C. García-Ruiz, Determination of nitrocellulose by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 149-155.
- [23] M. A. Fernández de la Ossa, F. Orteja-Ojeda and C. García-Ruiz, Discrimination of non-explosive and explosive samples through nitrocellulose fingerprints obtained by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 197-204.
- [24] B. J. Kim, J. E. Alleman and D. M. Quivey, Alkaline hydrolysis/biodegradation of nitrocellulose fines, National Technical Information Service of the US Department of Commerce, technical report ADA 359192, Aug 1998.
- [25] T. L. Su and C. Christodoulatos, Destruction of nitrocellulose using alkaline hydrolysis, National Technical Information Service, US Department of Commerce, ADP017728, May 1996.
- [26] M. Raesi and G. D. Najafpour, Alkaline hydrolysis of waste nitrocellulose for recovery of pure cellulose, *Iranica J. Energy and Environ.* 2 (2011) 221-228.
- [27] C. Christodoulatos, T. L. Su and A. Koutsospyros, Kinetics of the alkaline hydrolysis of nitrocellulose, *Water. Environ. Res.* 73 (2001) 185-191.
- [28] E. Alinat, N. Delaunay, C. Costanza, X. Archer and P. Gareil, Determination of the nitrogen content of nitrocellulose by capillary electrophoresis after alkaline denitration, *Talanta* 125 (2014) 174-180.
- [29] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics : Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [30] B. J. Kim, H. N. Hsieh and F. J. Tai, Aerobic digestion and acid hydrolysis of nitrocellulose, US Army corps of engineers, US Army corps of engineers, CERL technical report 99/45, April 1999.
- [31] D. N. S. Hon and T. L. Gui, Photodegradation of cellulose nitrate, *Polymer Biochem.* 7 (1986) 299-310.
- [32] F.C. Hill, L.K. Sviatenko, L. Gorb, S.I. Okovytyy, G.S. Blaustein, J. Leszczynski, DFT M06-2X investigation of alkaline hydrolysis of nitroaromatic compounds, *Chemosphere* 88 (2012) 635-643.
- [33] M. Edge, N. S. Allen, M. Hayes and P. N. K. Riley, Mechanisms of deterioration in cellulose nitrate base archival cinematograph film, *Eur. Polym. J.* 26 (1990) 623-630.

**CHAPITRE III – Nouvelle méthode pour la détermination du taux de
nitration de la nitrocellulose basée sur l'étude du ratio molaire des
concentrations en ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse alcaline
(article)**

**A new method for the determination of the nitrogen content of nitrocellulose based on
the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis**

Elodie Alinat^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{1,3,4}, Xavier Archer², Jean-Maurice Mallet^{4,5,6}, Pierre Gareil^{1,3,4*}

Journal of Hazardous Materials, (2014), soumis

¹Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), 75015 Paris, France

³CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France

⁴UPMC, Université Paris 6, 75005 Paris, France

⁵ENS, Laboratory of Biomolecules (LBM), 75005 Paris, France

⁶CNRS, UMR 7203, 75005 Paris, France

Key words: *nitrocellulose, nitrite, nitrate, nitrogen content, alkaline hydrolysis, smokeless gunpowder*

Abstract

A brand new method was proposed to determine the nitrogen content of nitrocelluloses (NCs). This method is based on the finding of a linear relationship between the nitrogen content and the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis under fixed given conditions. Capillary electrophoresis was used to monitor the concentration of nitrite and nitrate ions. The influences of hydrolysis time and molar mass of NC on the molar ratio of nitrite to nitrate ions were investigated, and the obtained data were analyzed to bring new insights into the understanding of the alkaline denitration mechanism of NCs, which sustain the principle underlying this analytical strategy. The proposed method was then tested successfully with various explosive and non-explosive NC-containing samples such as various daily products and smokeless gunpowders. Inherently to its principle exploiting a concentration ratio, this method shows very good repeatability with relative standard deviation (n=3) inferior to 1.5%, and also provides very significant advantages with respect

to sample extraction, analysis time (1 h for alkaline hydrolysis, 3 min for electrophoretic separation), which was about 5 times shorter than for the classical Devarda's method, currently used in industry, and safety conditions (no need for preliminary drying NC samples, mild hydrolysis conditions with 1 M sodium hydroxide for 1 h at 60 °C).

1. Introduction

Cellulose nitrate, also more commonly called nitrocellulose (NC), is prepared by nitration of cellulose in nitric and sulfuric acid mixtures¹. Cellulose is a natural linear polysaccharide composed of glucose units linked by β (1 \rightarrow 4) glucosidic bonds. In each of the repeating glucose units, three reactive hydroxyl groups (one primary hydroxyl group on the C6 position and two secondary hydroxyl groups on the C2 and C3 positions) are able to undergo esterification reaction, which results in the replacement of the hydroxyl groups by nitro groups in an acidic medium. The degree of substitution (DS), defined as the average number of hydroxyl groups exchanged by nitrate groups per glucose unit, depends on the synthesis conditions used. In current applications, it is most often expressed as the nitrogen content of the NC. Theoretically, the highest achievable nitrogen content is close to 14.15% corresponding to fully nitrated nitrocellulose, having a DS of 3. In practice, however, the maximum attainable nitrogen content is 13.8% [2]. Indeed, the synthesis of fully-nitrated nitrocellulose is expensive and dangerous, generating unstable compounds such as sulfuric cellulose esters [1]. The nitrogen content of NCs is one of the most important parameter determining their applications, since it strongly affects its physical and chemical properties [2]. NC solubility decreases when the nitrogen content and the degree of polymerization (DP) increase. NCs with a nitrogen content below 12.5% (DS close to 2) are widely used as raw material in daily products (lacquers, varnishes, paints, nail polish, ping pong ball, filter membranes, printing inks, and more recently liquid bandage). Highly-nitrated NCs having a nitrogen content higher than 12.5% are employed in the manufacturing of energetic materials such as propellants and dynamites.

NC-based smokeless gunpowders are classified according to the number of energetic materials in their composition [3,4]: i) single-base propellants, which mainly contain NC, ii) double-base propellants consisting of NC and nitroglycerin, and iii) triple-base propellants containing NC, nitroglycerin, and nitroguanidine. Most smokeless gunpowders are formulated with graphite and various other chemicals (such as dinitrotoluene) to monitor burning, reduce muzzle flash, and make them more water resistant. Due to NC deterioration over time (release of nitric acid), smokeless gunpowders also contain small amounts of stabilizers (diphenylamine, diphenyl ureas such as ethyl centralite or methyl centralite) to neutralize acidic byproducts.

NC characterization remains challenging due to its high molar mass, complex structure, lack of solubility in common organic solvents, both molar mass and functional dispersity, and consideration of safety constraints. Acido-basic titration (Devarda's method [5]), vibrational spectroscopy [6,7], mass spectrometry [8-10], gas chromatography [11-13], reversed phase [14,15], ion [16-19], and size exclusion [20,21] chromatography, and capillary electrophoresis [22-24] have been used to characterize NC. Before implementing most of them, long and tedious sample treatment, especially involving alkaline denitration in the absence [18] or in the presence of hydrogen peroxide [5], are needed. Beforehand, for most of them, dangerous NC drying before precise weighing is required. In addition to this, when NC is present in a formulated sample, it should be first extracted to remove potential interfering components or simply to isolate it before weighing. To this aim, a new protocol involving a multistep solvent extraction has just been developed by López-López et al. to isolate NC from smokeless gunpowders [3]. In spite of the existence of all these methods, few of them are relevant for the determination of the nitrogen content of NCs employed in smokeless gunpowders, and there is still a strong demand from analysts to reduce overall analysis time, simplify sample treatment, and improve safety of the assay.

Following our previous work on the optimization by experimental design of alkaline denitration reaction for maximum denitration yield [25] (Part II, Chapter II), the molar ratio of nitrite to nitrate ions released during this reaction was investigated in depth. Capillary electrophoresis (CE) was used to monitor the released nitrite to nitrate ions by a previously developed method [24]. This study was conducted using nine NC standards of known nitrogen content (from 11.14% to 13.42%) and molar mass (from 20 000 to 312 000 g mol⁻¹). The influence of reaction time was considered and data were analyzed to gain a deeper insight into the understanding of the alkaline denitration mechanism of NCs. This work opens a new route to discriminate NCs according to their nitrogen contents, based on the molar ratio of nitrite to nitrate ions found in the post-hydrolysis solution. This strategy was successfully applied to as various NC-containing samples as ping pong ball, nail polish, NC membrane, liquid bandage, and smokeless gunpowder to determine their nitrogen content and demonstrate its suitability for real sample analysis, minimizing extraction steps and rendering NC drying useless, thus improving safety conditions.

2. Experimental section

2.1. Standards, real samples, and electrolytes

NC standards (Table II-III-1) with a nitrogen content of 11.20 ($M_w = 35\,000\text{ g mol}^{-1}$ and $M_w = 137\,000\text{ g mol}^{-1}$), 12.00 ($M_w = 312\,000\text{ g mol}^{-1}$), and 12.20 ($M_w = 29\,000\text{ g mol}^{-1}$) were supplied by Dow Chemical

Company (Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Germany). NC samples with a nitrogen content of 11.14 ($M_w = 20\,000\text{ g mol}^{-1}$), 12.09 ($M_w = 95\,000\text{ g mol}^{-1}$), 12.55 ($M_w = 200\,000\text{ g mol}^{-1}$), and 13.42 ($M_w = 69\,000\text{ g mol}^{-1}$ and $M_w = 110\,000\text{ g mol}^{-1}$) were given by the Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP, Paris, France).

Table II-III-1: Nitrogen content, substitution degree, and molar mass of the nine studied commercially available NC standards.

Identification code	Nitrogen content (%)	Substitution degree	M_w (g/mol)	Explosives properties	Damping agent
NC1	11.14	2.0	20 000	no	ethanol
NC2	11.20	2.0	35 000	no	ethanol
NC3	11.20	2.0	137 000	no	ethanol
NC4	12.00	2.3	312 000	no	ethanol
NC5	12.09	2.3	95 000	no	ethanol
NC6	12.20	2.3	29 000	no	ethanol
NC7	12.55	2.4	200 000	yes	water
NC8	13.42	2.8	69 000	yes	water
NC9	13.42	2.8	110 000	yes	water

NCs were stored with a damping agent (water or ethanol) content of approximately 30%. Additional NC standards with nitrogen contents of 11.7 and 12.9%, which were not commercially available to us, were prepared by precisely mixing the appropriate amounts of NC2 with NC6, and NC6 with NC8, respectively, in 8:2 (w/w) proportions. Samples of single-base smokeless gunpowders with and without graphite (mixtures of NC, diphenylamine, dibutylphthalate, dinitrotoluene, potassium sulphate, and calcium carbonate) were provided by LCPP. Ping pong balls, nail polish, and liquid bandage were purchased from a local store. Amersham Biosciences NC membranes (Hybond-C-Extra) were supplied by Dominique Dutscher (Brumath, France).

Sodium nitrite (> 97%), sodium nitrate (> 99%), hexadimethrine bromide (HDMB) used as a coating agent, and sodium molybdate dihydrate ($\geq 99.5\%$) used as internal reference were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Concentrated volumetric solutions (ConvoL Normadose®) of 1 M sodium hydroxide used as base for NC hydrolysis were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

The nitrite, nitrate, and molybdate ion stock solutions (1 g L^{-1}) were prepared weekly by dissolving the appropriate amount of sodium salt in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3-UV system (Millipore, Molsheim, France) and stored at 4°C . HDMB solution at 1 g L^{-1} was prepared weekly by dissolving 0.01 g in 10 mL of ultra-pure water and stored at 4°C . Sodium phosphate monobasic (> 99%) and sodium phosphate dibasic (> 99%) from Sigma Aldrich were used for electrolyte preparations. Stock solution at 77.4 mM (200 mM ionic strength) of phosphate buffer was prepared by mixing the

appropriate amount of sodium phosphate monobasic and sodium phosphate dibasic in ultra-pure water. Background electrolytes were prepared daily by dilution from the stock solution at 200 mM ionic strength and filtered through a 0.20 μm cellulose acetate membrane (VWR).

2.2. Instrumentation

Separations were carried out with a Beckman Coulter® P/ACE MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with a diode array detector. Data processing and acquisition were performed using 32 Karat® 8.0 software (Beckman Coulter).

All NC standards were dried with an oven (model UNB100) from Memmert (Schwabach, Germany) to remove damping agent. Alkaline denitration experiments were performed with a block heater (model SBH 130D) from Stuart (Staffordshire, UK) capable of receiving twelve 10-mL glass tubes.

2.3. Electrophoretic conditions

Nitrite and nitrate ions were determined by a CE method previously developed by our group for this aim [24]. Briefly, separations were performed using Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries supplied by Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with dimensions of 60 cm (50 cm to the detector) \times 50 μm i.d. \times 365 μm o.d.. Before first use, capillaries were conditioned by flushing with 1 M NaOH followed by 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution at 1 g L⁻¹, and finally background electrolyte (BGE), each under 14.5 psi (\sim 1 bar) for 10 min (15 capillary volumes). The BGE was 100 mM ionic strength sodium phosphate buffer at pH 7.7. Before each run, the capillary was rinsed with HDMB solution under 14.5 psi for 1 min (about 1.5 capillary volume) and BGE under 14.5 psi for 2 min (about 3 capillary volumes). Injections were performed hydrodynamically under 0.5 psi for 3 s (0.3% of capillary volume). Separations were conducted under -30 kV (reversed polarity). Capillary cartridge temperature was maintained at 25°C. The detection wavelength was set at 210 nm with a reference at 310 nm and with bandwidths set at \pm 10 nm and \pm 40 nm, respectively. After the last analysis of the day, capillary was rinsed with water under 14.5 psi for 10 min (15 capillary volumes) and stored in the apparatus both ends in water.

2.4. Alkaline hydrolysis of NC standards

Prior to hydrolysis, about 40 mg of wet NC were placed in weighed 10-mL glass tubes and dried in an oven at 100°C for 2 h to ensure constant weight. Then, to reach room temperature, tubes containing dry NC were placed for 25 min in a glass desiccator. After the drying step, the glass tubes containing dry NC were weighed again in order to obtain the exact amount of NC subjected to alkaline hydrolysis. Next, 5 mL of 1 M sodium hydroxide solution were introduced into each tube containing dry NC and the tubes were screw-capped. The stopped tubes were placed in the block heater and heated at 60°C

for the determined reaction time within the studied range (5 min – 1 h). When the reaction time ended, a defined volume of hydrolysate was transferred into water containing the appropriate amount of the internal standard solution at 1 g L^{-1} . The dilution factor (between 2 and 20) was adapted according to sample. Prior to electrophoresis analysis, all samples were filtered through a $0.20 \mu\text{m}$ cellulose acetate membrane. This protocol was repeated for each studied reaction time and NC standard samples. Finally, nitrite and nitrate ion concentrations in hydrolysates were determined by CE analysis.

2.5. Real samples

To isolate NC from a single-base smokeless gunpowder, about 0.5 g of smokeless gunpowder was subjected to a multistep solvent extraction procedure that was adapted from [3]. Figure II-III-1 summarizes the different steps involving five consecutive solvent extractions.

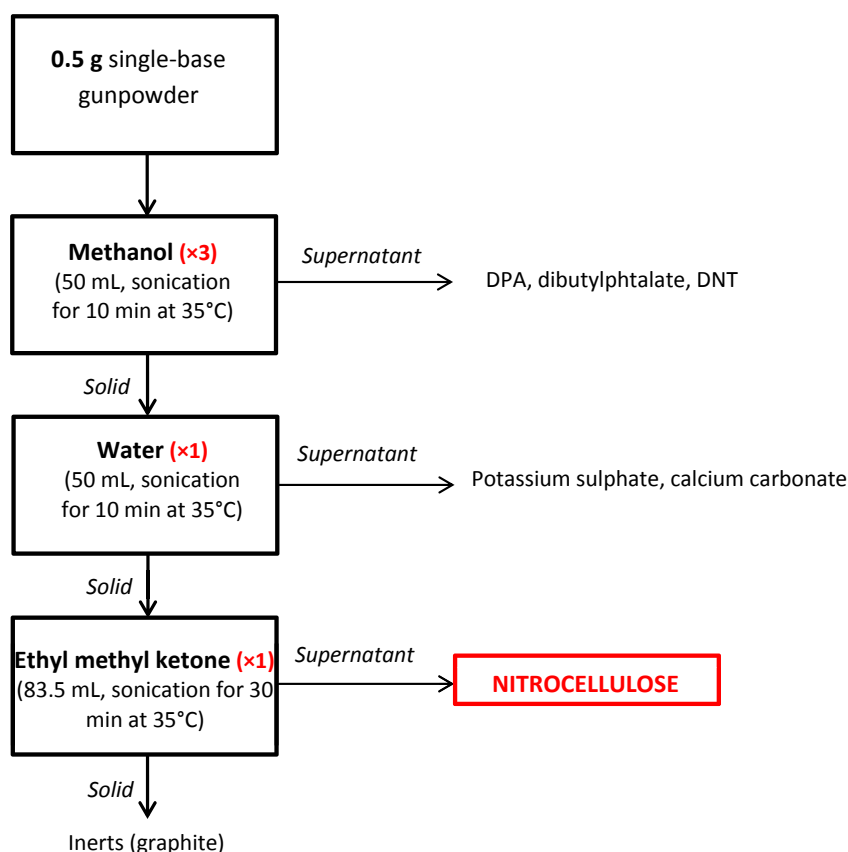


Figure II-III-1. Diagram summarizing the different steps to extract nitrocellulose from single-base smokeless gunpowders, adapted from [3].

The final extract containing NC was introduced into glass tubes and placed in a boiling water bath (at 100°C) until complete solvent evaporation. Next, 5 mL of 1 M sodium hydroxide solution were introduced into the glass tubes containing the residues obtained after solvent removal. The stopped tubes were placed in the block heater and heated at 60°C for 1 h. The denitration reaction was stopped

by transferring the tubes into an ice bath for 15 min to lower the temperature very quickly. After 25 min at room temperature, 250 μL of the hydrolysates were introduced into a 10 mL volumetric flask containing 200 μL of the internal standard solution at 1 g L^{-1} and supplemented to the mark with ultra-pure water.

About 60 mg of ping pong ball or NC membrane were introduced into 10-mL glass tubes and dissolved in 3 mL acetone under stirring. The mixture was placed in an oven at 60°C until complete solvent evaporation. Then, 5 mL of 1 M sodium hydroxide solution were introduced into the glass tubes containing the residue obtained by removing the organic solvent. The stopped tubes were placed in the block heater and heated at 60°C for 1 h. The end of the protocol was identical to that described above for NC in smokeless gunpowder.

For the hydrolysis of nail polish and liquid bandage, approximately 0.3 g of liquid matter were placed directly in 10-mL glass tubes. Next, 5 mL of 1 M sodium hydroxide solution were added into the glass tubes. The samples were then hydrolyzed at 60°C for 1 h with 1 M sodium hydroxide solution. The rest of the protocol was identical to the one described before for NC in smokeless gunpowder.

2.6. Calculation of the denitration yield

Quantitation of nitrite and nitrate ions by CE was performed by using an external standard calibration method. The denitration yield was calculated according to equation (1):

$$\text{Yield} = \frac{\% N \text{ experimental}}{\% N \text{ manufacturer}} = \frac{\left(\frac{([\text{NO}_2^-] \times f \times M_N \times V_{\text{NaOH}})}{M_{\text{NO}_2} \times 10^6} + \frac{([\text{NO}_3^-] \times f \times M_N \times V_{\text{NaOH}})}{M_{\text{NO}_3} \times 10^6} \right)}{\% N \text{ manufacturer} \times m_{\text{NC}}} \times 100 \quad (1)$$

where %N experimental is the nitrogen content obtained experimentally, %N manufacturer the nitrogen content given by the manufacturer, $[\text{NO}_2^-]$ and $[\text{NO}_3^-]$ are the concentrations of nitrite and nitrate ions in mg L^{-1} , f the dilution factor, M the molar mass, V_{NaOH} the volume of sodium hydroxide in mL and m_{NC} the amount of NC in gram.

2.7. Safety considerations

NC in dry state is a highly flammable solid that ignites easily and burns explosively when is concealed. This is why it should always be stored wet. NCs having nitrogen content higher than 12.5% are classified as explosives. NC can be ignited by flame, heat, shock, friction, sparks or static electricity. Its explosive propensity depends on the nitrogen content. The higher the nitrogen content, the easier it can explode. The oven door opening and closing system was modified to prevent confinement in case of explosion. Special attention was paid to keep NC samples wet when stored in a refrigerator and to weigh them after drying in the desiccator to avoid any shock. Security glasses and protection clothes were worn by the operator. In addition, weighing of dry matter was always performed under

the assistance of a person equipped with a water vaporizer to prevent from any fire start. Working under less than 30 mg dry matter considerably reduces hazard risks. Indeed, it is worthy of note that no incident has occurred over more than one hundred assays that have been realized to date under these experimental conditions.

3. Results and discussion

3.1. Influence of the nitrogen content of NC on the molar ratio of nitrite to nitrate ion

Several works have already shown that the alkaline hydrolysis of NCs mainly results in NC denitration, with nitrite and nitrate ions being the very main compounds containing nitrogen [26]. The release of these anions has been so far explained by competitive reactional mechanisms [27]. Although this mechanism does not allow to specify a value for this ratio, a nitrite to nitrate molar ratio close to 3 has been set forth, regardless of the nitrogen content of the NC [26], and of hydrolysis time, suggesting a single step process [28]. Unexpectedly, however, from our preceding work on the optimization of the reaction conditions for maximizing the denitration yield of explosive and non-explosive NCs, some correlation between NC nitrogen content and the molar ratio of nitrite and nitrate clearly appears, for all hydrolysis conditions tested in the experimental design [25] (Part II, Chapter II). Furthermore, these ratios seem to be almost independent of sodium hydroxide concentration (within the range 1-5 M), temperature (within the range 60 - 90°C), and reaction time (within the range 1 – 4 h) used for alkaline hydrolysis. The plot of the molar ratio of nitrite to nitrate ions versus NC nitrogen content from the data obtained with the nine NC standards presented in Table II-III-1 was given in Part II, Chapter II (Figure II-II-5) for the central point, repeated 6 times, of the experimental design.

Following this study, the influence of nitrogen content on the molar ratio of nitrite to nitrate ions released during the alkaline hydrolysis of the nine NC standards was investigated in depth, for shorter reaction times than studied before (0 – 1 h), in 1 M sodium hydroxide at 60°C. These latter conditions were chosen as they corresponded to those leading to maximum denitration yield for highly-nitrated NCs (except for time) and as they were more user-friendly. Figure II-III-2 shows the obtained variations of molar ratio of nitrite to nitrate ions as a function of time for 6 NC standards differing in nitrogen content and molar mass.

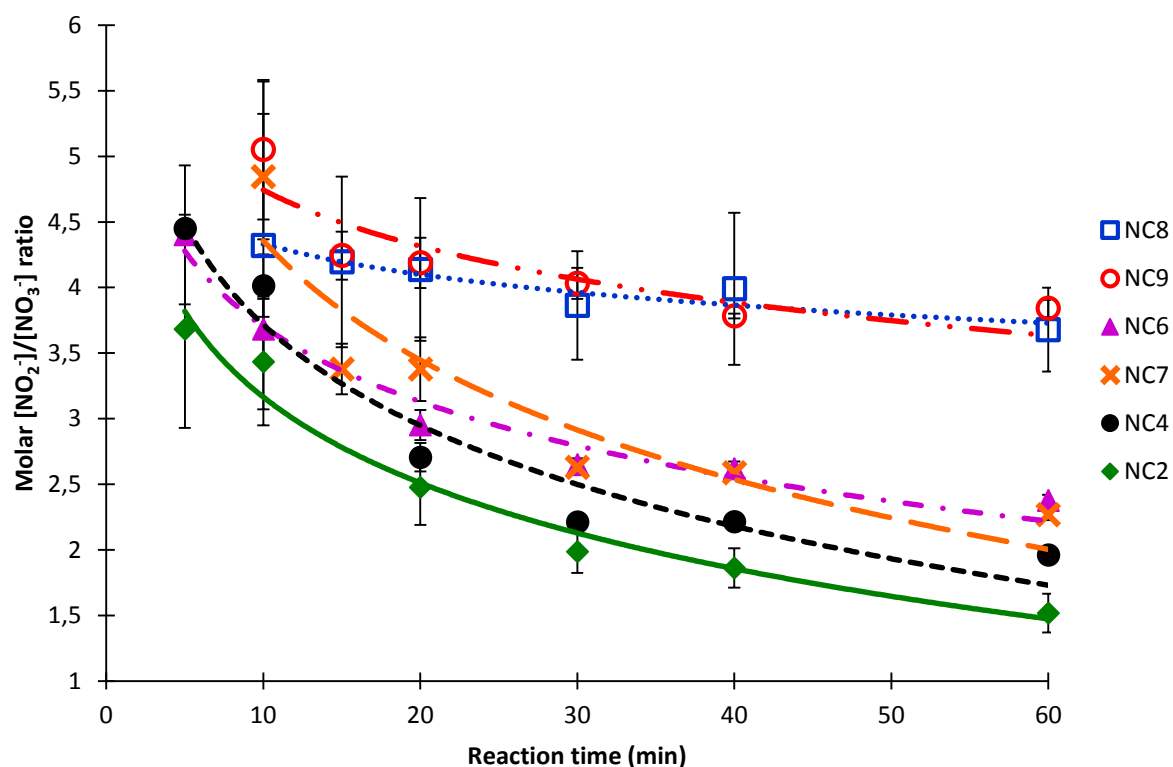


Figure II-III-2. Representation of the molar concentration ratio of nitrite to nitrate ions as a function of the reaction time for hydrolysis at 60°C with 1 M sodium hydroxide. Error bars represent \pm one standard deviation. NC identification: see Table II-III-1.

Over the first hour of reaction, a decrease in this ratio occurs likely towards a limiting value, but a clear differentiation of the NCs according to their nitrogen content still remain apparent, especially between the explosive and the non-explosive ones (except for NC7, the case of which will be discussed later). Interestingly, some of the curves obtained exhibit parallel evolutions (NC2, NC4, NC7), while some others are crossing (NC8 / NC9 or NC6 / NC7), which could be due to both the closer values of nitrogen contents and the higher standard deviations for the measurements performed for reaction times lower than 30 min. Furthermore, the molar mass of the NCs seems to hardly have an impact on the nitrite to nitrate molar ratios obtained after a one-hour hydrolysis, as exemplified by standards NC8 and NC9, having the same nitrogen content, but different molar masses (69 000 and 110 000, respectively). To provide a deeper insight into the observed phenomena, the denitration yields obtained for these six NC standards over the first hour of reaction were represented in Figure II-III-3.

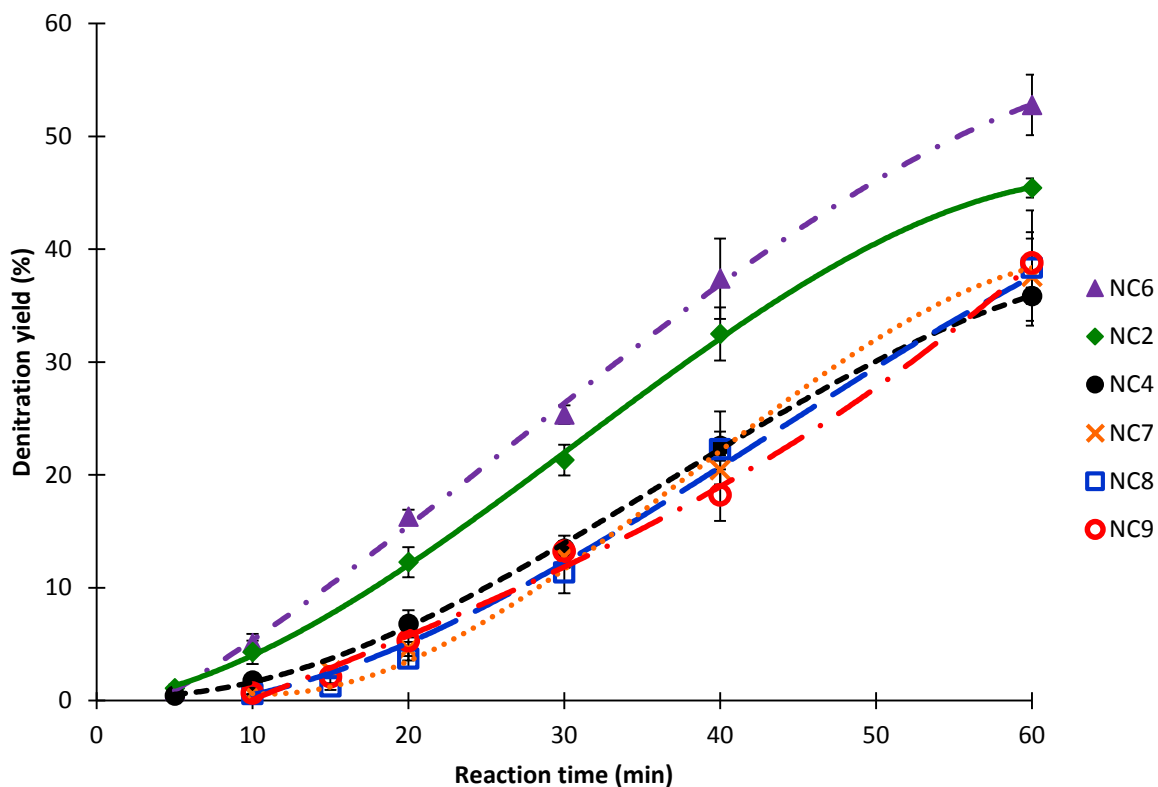


Figure II-III-3. Representation of the denitration yields as a function of the reaction time for hydrolysis at 60°C with 1 M sodium hydroxide. Error bars represent \pm one standard deviation. NC identification: see Table II-III-1.

Over this time period, denitration yields inferior to 50% were obtained. For reaction time lower than 20 min the obtained denitration yields were even less than 20%. These low values help to explain the high standard deviations obtained for the molar ratio of nitrite to nitrate ions at these times in Figure II-III-2. It is worthy of note that for non-explosive NCs, denitration yields increased in the reversed order of their molar masses, while for explosive NCs, lower denitration yields were obtained on the whole, displaying much less influence of their molar masses. Figure II-III-4 shows the plot of the molar ratio of nitrite to nitrate ions versus NC nitrogen content for the nine NC standards after one hour's hydrolysis by 1 M sodium hydroxide at 60°C.

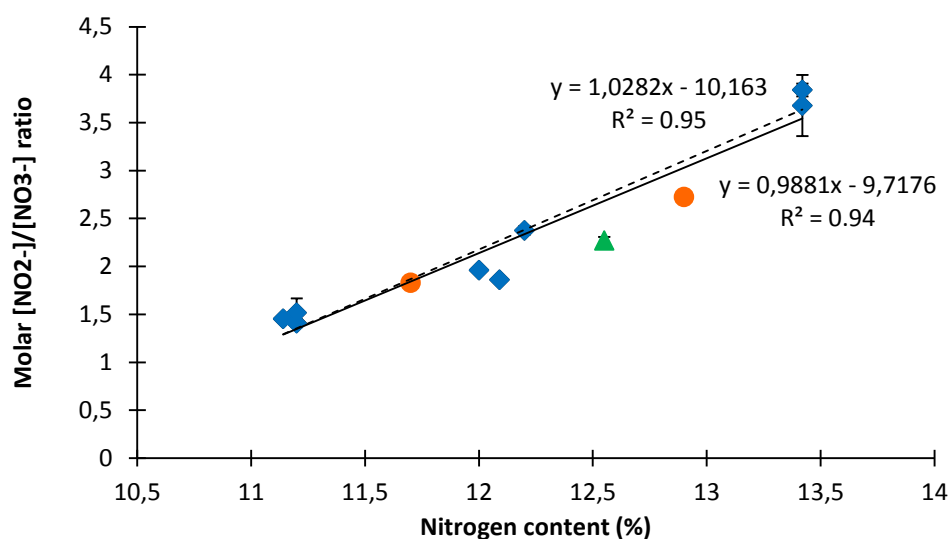


Figure II-III-4. Plot of the molar concentration ratio of nitrite to nitrate ions *versus* the nitrogen content of NC standards for hydrolysis at 60°C for 1 h with 1 M sodium hydroxide. NC identification: blue diamonds and green triangle: commercial NC standards (see Table II-III-1); orange circle: additional NC standards prepared by mixing of two commercial NC standards. Error bars (sometimes hidden by the symbols) represent \pm one standard deviation ($n = 3$). Dashed line: least-squares regression correlation for all commercial NC standards but NC7 (green triangle) (eight points). Full line: least-squares regression correlation for the eight preceding commercial NC standards + the two additional standards prepared by mixing (orange circles) (ten points).

As already obtained in previous work (see Figure II-II-5 in Part II, Chapter II), a strong linear correlation exists between the molar ratio of nitrite to nitrate ions and the nitrogen content. It is worthy of note that the experimental point for NC7 is below the straight line, suggesting that the obtained nitrogen content for this sample might be lower than that given by the manufacturer. This result is consistent with the observed time variation of molar ratio of nitrite to nitrate ions for this sample, which made it closer to the behavior of a non-explosive NC, and confirmed the abnormal behavior reported in our earlier work (Part II, Chapter II). Therefore, this standard was not considered in the remainder of the study. Least-square linear regression performed on the molar ratio of nitrite to nitrate ions obtained for the remaining eight commercial NCs resulted in a determination coefficient equal to 0.95 with a residual standard deviation of 0.23. As the nitrogen contents of the commercially available NC standards were not evenly distributed over the whole nitrogen content range (11.2 – 13.5%), two additional NC standards were carefully prepared at 11.7 and 12.9% by mixing the appropriate amounts of commercial NC standards. As shown in Figure II-III-4, the addition of these new NC standards does not significantly alter either the obtained determination coefficient (equal to 0.94) or the residual standard deviation (0.23). The nitrogen content of NC7 was then recalculated using the linear regression obtained from the ten NC standards altogether, and a value of 12.1% was obtained. This

value, lower than 12.5%, corresponds to the one for a non-explosive NC, consistently with the behavior observed in Figure II-III-2 for this NC.

3.2. Highlight on the alkaline denitration reaction

The results obtained in this work (see especially Figure II-III-2) demonstrate that the molar ratio of nitrite to nitrate ions could be very different from 3, as anticipated from previous literature [26,28], and varies in the time course of the denitration reaction. This provides a deeper insight into the understanding of the kinetics of the competing denitration reactions. NC is a statistical assembly of nitrated glucose units linked in β (1 \rightarrow 4). It is thus composed by the statistical/ random association of non-nitrated glucose unit, mono-nitrated (3 cases), di-nitrated units (3 cases, one of them is 2,3-dinitro), and trinitrated units (see Figure II-III-5).

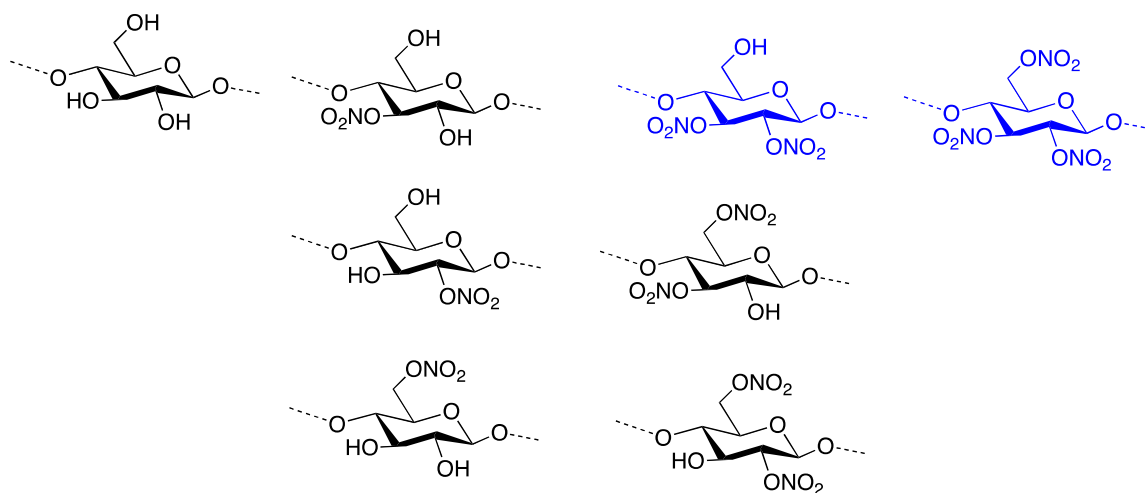


Figure II-III-5. Glucose units present in NCs. Vicinal nitrate glucopyranoses are in blue.

Accordingly, nitration ratio is practically expressed as the percentile nitrogen content, which gives an evaluation of the mean value of substitution (in comparison with theoretical percents: mono: 6.8%; di: 11.1%; tri: 14.1%). Clearly, a "dinitrated" (11.1% nitrogen) NC contains also mono and trinitrated units. In these glucopyranose units (Figure II-III-5), two different environments for nitrate groups, *viz* isolated nitrates (close to OH or OCH) and vicinal nitrates, can exist.

Our working hypothesis is that the nitrate groups in a vicinal nitrate tandem are hydrolyzed faster and give a higher molar nitrite-to-nitrate ratio (a combined ratio around 6 for the two nitrates). By contrast, the isolated nitrate groups are hydrolyzed slower and give a lower ratio, around 1.5. This hypothesis is consistent with the final nitrite to nitrate ratio, linearly dependent on nitrogen content (i.e. vicinal nitrate content). It is also consistent with the kinetics of the observed nitrite-to-nitrate ratio: (i) high and almost constant for trinitrated NC (as all glucopyranose units contained vicinal nitrates), and (ii) decreasing for less nitrated compounds, due to random mixture of glucopyranoses. The trinitrate units are present even in NCs having a nitrogen content of 11%, and they account for the

high initial ratio. Once hydrolyzed, the ratio falls to the one corresponding to isolated nitrates. As NCs, especially highly nitrated ones, are insoluble in aqueous NaOH, a delay time of about 5 min is needed for the hydration process, before the denitration starts.

The proposed mechanism of the two pathways (a and b) of the alkaline denitration is depicted on Figure II-III-6 for a dinitrate unit. In the first one (a), the hydroxide ion attacks the positive nitrogen, giving back the alcohol and nitrate ion; this reaction is probably not perturbed by carbohydrate modifications far from the nitrogen center. In the second one (b), the hydroxide ion attacks the proton close to the nitrate, leading to a ketone and a nitrite ion: the alcohol is oxidized and the nitrogen reduced. This mechanism is well known for chromate, permanganate oxidation of alcohols, in Swern oxidation [29]. Pathways (b) will be favored (as compared to pathway (a)) by the presence of electro-attracting groups enhancing the acidity of this proton, such as a nitrate or a keto group, so b2 and b3 steps are expected to be faster than b1. This mechanism explains the fast and predominant pathway (b) in vicinal nitrated blocks, which is consistent with the high initial nitrite-to-nitrate ratio, and the high initial denitration rate.

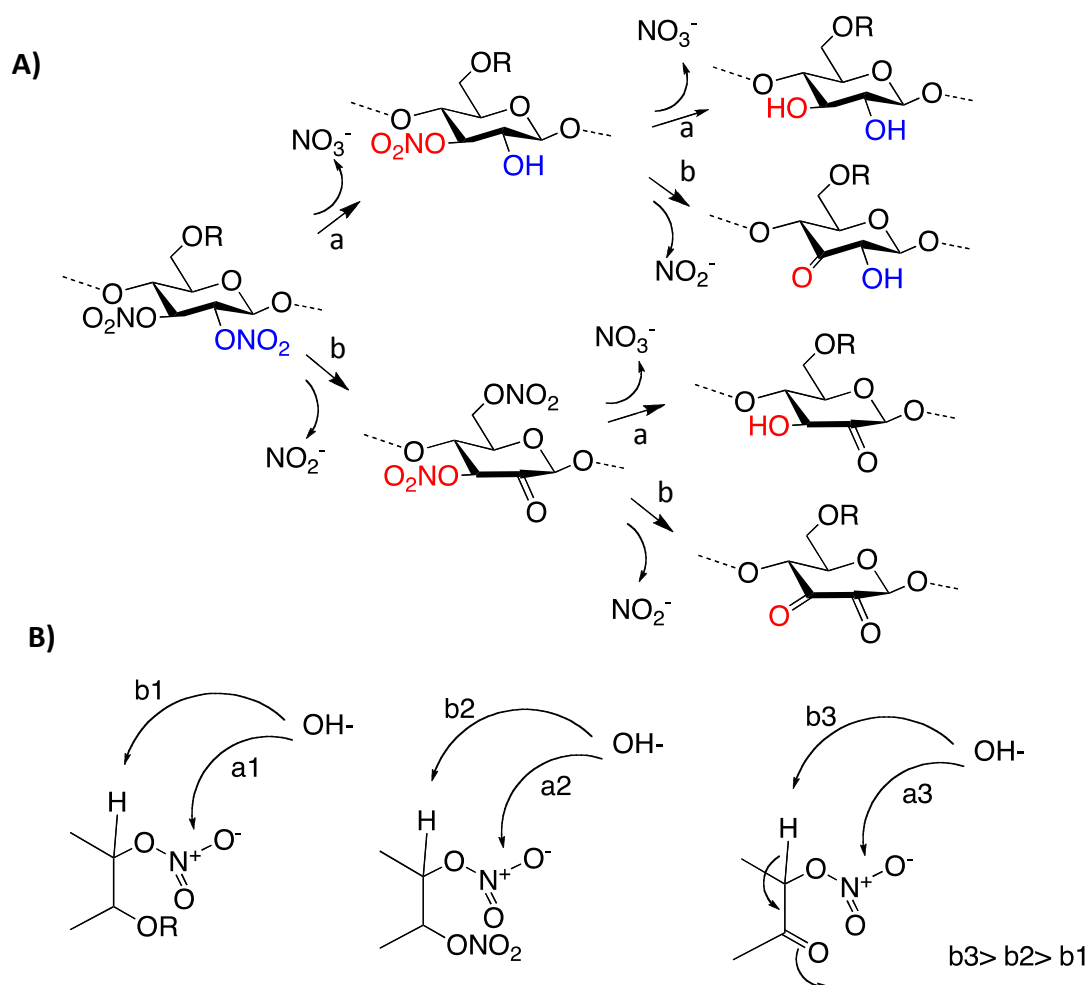


Figure II-III-6. Denitration mechanisms: A) pathways for vicinal nitrate alkaline "hydrolysis" B) the three environments for a nitrate group and kinetics comparison.

3.3. Applications to real samples

The correlation between the molar ratio of nitrite to nitrate ions and the nitrogen content of NC standards (Figure II-III-4) prompted us to consider this approach for the determination of nitrogen content of NCs used in various real formulated samples, such as a ping pong ball, a NC membrane, a liquid bandage, a nail polish, and smokeless gunpowders with or without graphite. As far as sample treatment is concerned, solid samples from ping pong ball and membrane were merely solubilized in acetone, next evaporated, and the residue was submitted to the alkaline hydrolysis. Liquid samples (nail polish and liquid bandage) were directly submitted to the alkaline hydrolysis without any pretreatment. Single-base smokeless gunpowders were treated according to a recently reported procedure for isolating NC [3] that we adapted for this type of matrix. Given the approximate NC content in smokeless gunpowders, the initial sample amount to be treated was evaluated so as to realize three alkaline hydrolyses on three independent extractions. This amount, however, could eventually be strongly reduced, insofar as the final sample of nitrite and nitrate ions submitted to CE was diluted forty times in the present protocol. For the alkaline hydrolysis conditions, a sodium hydroxide concentration of 1 M at 60 °C temperature, and 1 h time were retained. These conditions were less stringent than those leading to maximum denitration yields for explosive and non-explosive NCs, as previously determined from a multivariate study of the denitration reaction [25,26] (Part II, Chapter II). The reaction time was fixed at 1 h as this time led to lower RSDs than even shorter times for the nitrite to nitrate ratios with standard NCs (Figure II-III-2). A typical electrophoregram of an alkaline hydrolysate of NC contained in nail polish is presented in Figure II-III-7, demonstrating there were no interfering peaks within the migration time of nitrite, nitrate, and molybdate ions (internal standard). We did not succeed in identifying peak 5, having an effective electrophoretic mobility of ca $57 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

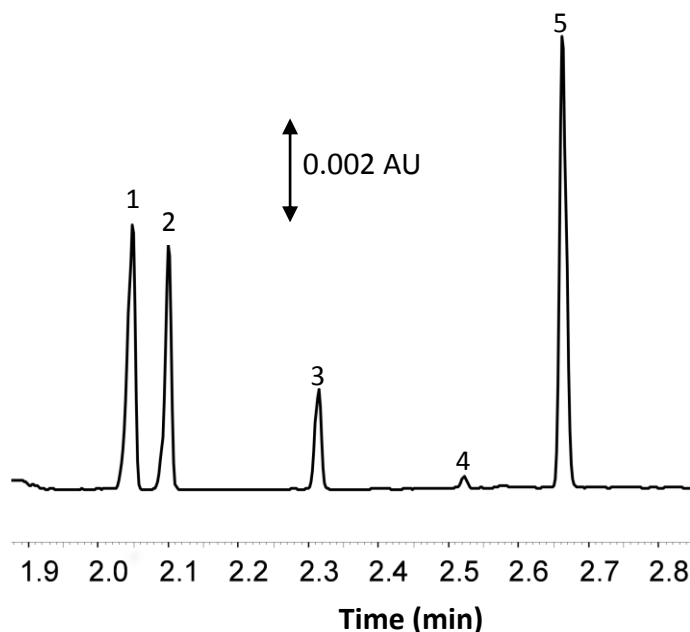


Figure II-III-7. Electropherograms of an alkaline hydrolysate of NC contained in nail polish spiked with MoO_4^{2-} at 20 mg mL⁻¹ and diluted 40 times with water. Hydrolysis conditions: 1 M NaOH for 1 h at 60°C. CE conditions: bare-fused silica capillary, 50 μm ID \times 60 cm (detection at 50 cm); electroosmotic flow reversal with 1 g L⁻¹ HDMB; BGE: 100 mM ionic strength sodium phosphate, pH 7.7; temperature: 25°C; applied voltage: -30 kV; hydrodynamic injection, 0.5 psi, 3 s; detection: UV at 210 nm. Identification: nitrite (1), nitrate (2), molybdate (3), unidentified (4, 5).

The results obtained for the nitrogen contents of the six real samples by using Figure II-III-4 as a calibration curve are given in Table II-III-2.

Table II-III-2: Nitrogen contents of NCs used in various formulated products obtained by the new method based on the molar ratio of nitrite to nitrate ions (this work), and as given by the manufacturer. Conditions for the alkaline hydrolysis: 1 M sodium hydroxide for 1 h at 60 °C.

Sample	Nitrogen content (%)		
	This work	RSD (%) (n = 3)	Manufacturer data
Ping pong ball	11.0 \pm 0.04	0.4	not available
NC membrane	11.4 \pm 0.03	0.2	< 12.5
Nail polish	11.8 \pm 0.01	0.1	10.9 - 12.2
Liquid bandage	11.8 \pm 0.01	0.1	11.7 - 12.2
Smokeless gunpowder without graphite	13.2 \pm 0.09	1.4	13.2 \pm 0.05
Smokeless gunpowder with graphite	13.3 \pm 0.04	0.3	13.2 \pm 0.05

Very good agreements with the data provided by the manufacturers, along with very narrow RSDs for most of them, were shown. It is worthy of note that this approach does not require (i) to quantitatively extract NC from a formulated sample, (ii) to obtain a pure extract (as long as co-extracted compounds do not release nitrite or nitrate ions under alkaline conditions), (iii) to know the

exact mass of dried NC involved in the assay, and (iv) to know the yield of the alkaline denitration reaction. Furthermore, as only a concentration ratio is used for the nitrogen content determination, a number of experimental error sources were suppressed. These factors are likely at the origin of the high repeatabilities experienced.

4. Conclusions

The finding of a linear relation between the nitrogen content of NCs and the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis, on one hand, and the kinetic study of the denitration reaction and interpretation of the involved mechanism, on the other hand, prompted us to develop a new valuable analytical strategy for the determination of the nitrogen content of NCs in smokeless gunpowders and various daily products. This method opens great perspectives as it provides significant improvements over those currently in use in industry, such as Devarda's, with respect to sample extraction, analysis time and perhaps most importantly safety conditions, while retaining similar high precision.

References

- (1) Saunders, C. W.; Taylor, L. T. *J. Energ. Mater.* 1990, 8, 149-201.
- (2) Fernández de la Ossa, M. A. ; López- López, M. ; Torre, M. ; García-Ruiz, C. *Trends Anal. Chem.* 2011, 30, 1740-1755.
- (3) López-López, M.; Fernandez de la Ossa, M. A.; Saiz Galindo, J.; Ferrando, J. L.; Vega, A.; Torre, M.; García-Ruiz, C. *Talanta* 2010, 81, 1742-1749.
- (4) López-López, M. ; Carlos Bravo, J. ; García-Ruiz C. ; Torre, M. *Talanta* 2013, 103, 214-220.
- (5) GEMO FN-102-A-1, 1989.
- (6) Moore, D. S.; McGrane, S. D. *J. Mol. Struct.* 2003, 661, 561-566.
- (7) Dolinak, D.; Wise, S.; H.; Jones, C. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2008, 29, 312-319.
- (8) Hakansson, K. ; Coorey, R. V. ; Zubarev, R. A. ; Talrose, V. L. ; P. Hakansson, P. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 337-346.
- (9) Mahoney, C. M. ; Gillen, G. ; Fahey, A. *J. Forensic Sci. Int.* 2006, 158, 39-51.
- (10) Meier-Augenstein, W. ; Kemp, M. F. ; Lock, C. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 2011-2016.
- (11) Cropek, D. M. ; Kemme, P. A. ; Day, J. M. ; Cochran, J. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 4346-4351.
- (12) Katoh, K. ; Le, L. ; Kumasaki, M. ; Wada, Y. ; Arai, M. ; Tamura, M. *Thermochim. Acta* 2005, 431, 161-167.
- (13) Katoh, K. ; Lu, L. ; Kumasaki, M. ; Wada, Y. ; Arai, M. *Thermochim. Acta* 2005, 431, 173-176.
- (14) Combs, M. T. United States Patent WO2013006218 A1.
- (15) Rooijen, P. V. Bachelor thesis, University of Amsterdam, 2013, www.science.uva.nl/onderwijs/.../f1544880797.
- (16) Cropek, D.; Dankowski, B. US Army Corps of Engineers, Engineer Research and Development Center, Technical report ERDC/CERL TR-00-14, May 2000.
- (17) MacMillan, D. K.; Majerus, C. R.; Laubscher, R. D.; Shannon, J. P. *Talanta* 2008, 74, 1026-1031.
- (18) López- López, M. ; Ramiro Alegre, J. M. ; García-Ruiz, C. ; Torre, M. *Anal. Chim. Acta* 2011, 685, 196-203.
- (19) Freedman, D. L.; Cashwell, J. M.; Kim, B. J. *Waste Manage.* 2002, 22, 283-292.
- (20) Deacon, P.; Macdonald, A.; Gill, P.; Mai, N.; Bohr, M. A.; Pontius, H.; Hust, M.; Klerk, W.; Bater, C. STANAG 4178 (ED2) (2009).
- (21) Marx-Figini, M. ; Soubelet, O. *Polym. Bull.* 1982, 6, 501-508.
- (22) Fernández de la Ossa, M. A. ; Torre, M. ; García-Ruiz, C. *Anal. Chim. Acta* 2012, 745, 149-155.
- (23) Fernández de la Ossa, M. A. ; Orteja-Ojeda, F. ; García-Ruiz, C. *J. Chromatogr. A* 2013, 1302, 197-204.
- (24) Alinat, E.; Delaunay, E.; Costanza, C.; Archer, X.; Gareil, P. *Talanta* 2014, 125, 174-180
- (25) Alinat, E.; Delaunay, E.; Costanza, C.; Archer, X.; Gareil, P. unpublished work, 2013, Paris.
- (26) Christodoulatos, C.; Su, T. L.; Koutsospyros, A. *Water. Environ. Res.* 2001, 73, 185-191.
- (27) Edge, M.; Allen, N. S.; Hayes, M.; Riley, P. N. K. *Eur. Polym. J.* 1990, 26, 623-630.
- (28) Su, T. L.; Christodoulatos, C. *National Technical Information Service, US Department of Commerce ADP017728* May 1996.
- (29) Omura, K.; Swern, D. *Tetrahedron* 1978, 34, 1651-1660.

Conclusion

Les travaux présentés dans ces trois chapitres ont permis le développement de nouvelles méthodes analytiques permettant de déterminer le taux de nitration de la NC et donc *a fortiori* de discriminer les NC explosives des NC non-explosives. Dans ces différentes méthodes, la détermination du taux de nitration de la NC est basée sur la quantification des ions nitrite et des ions nitrate libérés après hydrolyse alcaline. Tout d'abord, une méthode d'analyse par électrophorèse capillaire des ions nitrite et des ions nitrate applicable à l'analyse de matrices très basiques telles que des hydrolysats de NC a été développée. Ces deux anions ont pu être analysés par CE en moins de 3 min. Ces analyses ont permis d'atteindre des CV inférieurs à 0,05% pour les temps de migration normalisés et de 0,8% (ions nitrite) et 0,7% (ions nitrate) pour les aires corrigées normalisées suite à 20 analyses successives d'hydrolysats de NC. Les effets de matrices liés à la présence de soude concentrée ont été évalués à l'aide d'une approche statistique. Il est apparu qu'aucun effet de matrice n'a été observé en présence d'une matrice constituée de soude à une concentration de 0,5 M. Les effets de la température, de la concentration de la soude et de la durée de la réaction d'hydrolyse alcaline sur les rendements de dénitration ont dans un premier temps été étudiés grâce à une approche monovariée. Cette approche n'a pas permis de conclure sur l'effet de ces 3 paramètres sur les rendements obtenus. Après une hydrolyse à 70°C pendant 2h30 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 3 M, des rendements de dénitration de 84 ± 2 % et de 83 ± 1 % ont été obtenus pour les NC non-explosives et pour les NC explosives respectivement.

Ensuite, afin de maximiser les rendements de dénitration des NC explosives et non-explosives, une approche multivariée en utilisant un plan d'expérience de type composite centré a été mise en œuvre. Cette approche a permis de déterminer quels étaient les facteurs influents sur les rendements de dénitration et de mettre en évidence des différences de comportement entre les NC explosives et NC non-explosives qui sont liées à leurs différences de propriétés physico-chimiques. Pour chaque catégorie de NC (explosive et non-explosive), une analyse de la désirabilité portant sur ces 3 facteurs a permis de prédire les conditions optimales de dénitration. Ces conditions ont ensuite été confirmées expérimentalement pour les NC faiblement nitrées (3 h 45, NaOH 1 M, 90°C) et pour les NC explosives (4 h, NaOH 1 M, 60°C). La robustesse de ces conditions a ensuite été vérifiée. Ces nouvelles conditions de dénitration ont été finalement utilisées pour déterminer le taux de nitration de NC contenues dans des poudres propulsives de type simple base.

Enfin, une nouvelle approche permettant de déterminer le taux de nitration des NC à partir du ratio molaire des concentrations en ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse alcaline a été

développée. Une étude cinétique de l'évolution du ratio molaire au cours du temps a été menée et a permis de proposer un nouveau mécanisme de dénitration des NC. En effet, il a été démontré expérimentalement que le mécanisme de dénitration en milieu alcalin était différent selon le degré de substitution des NC. La durée de la réaction d'hydrolyse apparaît comme étant un paramètre clé influençant la valeur du ratio molaire obtenu. Cette étude a permis de mettre en évidence une corrélation linéaire entre le ratio molaire et le taux de nitration de la NC. Cette nouvelle approche présente de nombreux avantages car il n'est plus nécessaire (i) de connaître exactement la quantité de NC impliquée dans la réaction d'hydrolyse, (ii) d'obtenir un extrait pur, (iii) de connaître le rendement de la réaction de dénitration et (iv) d'extraire quantitativement la NC de la matrice. De plus, les conditions de dénitration utilisées (1 h, NaOH 1 M, 60°C) permettent de diminuer la durée totale de l'analyse. Cette méthode a été finalement appliquée avec succès à des NC contenues dans des poudres propulsives ainsi que dans des produits usuels (vernis à ongles, pansement liquide, balle de ping pong et membrane). Les coefficients de variation obtenus (<2 % pour n=3) sur les taux de nitration des NC présentes dans ces matrices permettent d'atteindre des précisions équivalentes à celles des méthodes utilisées actuellement dans l'industrie. Nous préconisons donc vivement l'emploi de cette nouvelle méthode pour la détermination précise, rapide et juste du taux de nitration des nitrocelluloses explosives et non-explosives.

**PARTIE III : APPROCHES FONDEES SUR L'HYDROLYSE ACIDE DE
LA NITROCELLULOSE : DEPOLYMERISATION**

Introduction

Comme décrit dans la partie bibliographique, une analyse de la NC par électrophorèse capillaire de zone couplée avec une détection par fluorescence induite par laser (LIF) après dérivation avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) a déjà récemment été envisagée. Cette approche a été utilisée par leurs auteurs pour discriminer des échantillons de NC explosives et non-explosives à partir du profil électrophorétique obtenu. Le traitement chimiométrique des empreintes électrophorétiques a non seulement permis de discriminer des NC selon leur taux de nitration mais également de les discriminer de celluloses (non-nitrées) susceptibles d'être présentes dans des résidus après attentat et donc d'interférer avec des NC.

Cependant, les quelques travaux décrivant l'analyse de la NC par CE-LIF ne proposent pas d'interprétation des profils électrophorétiques obtenus. En effet, aucune identification des pics présents sur les électrophorégrammes n'est proposée. De plus, les profils ont été obtenus à partir d'échantillons de NC issus de poudres propulsives assez anciennes (datant de 31 à 67 ans) et dont les masses moléculaires et les taux de nitration étaient inconnus ou approximatifs. Par ailleurs, compte tenu de l'insolubilité des NC dans le milieu de dérivation aqueux, le profil électrophorétique obtenu, utilisé pour le traitement des données, n'est certainement pas représentatif de l'ensemble de l'échantillon, étant donné sa très grande polydispersité en taille. En effet, seules les chaînes courtes, présentant des faibles degrés de polymérisation sont solubles dans ce milieu aqueux, et par conséquent peuvent être observées sur l'électrophorégramme. Ceci explique pourquoi les signaux obtenus sur les électrophorégrammes présentent une très faible intensité, en relation avec la faible occurrence de ces chaînes courtes dans l'ensemble de l'échantillon. Ces différents points réduisent fortement le crédit que l'on peut accorder à cette approche.

Cette partie propose donc une ré-évaluation de la caractérisation des NC à partir de leur dérivation par l'APTS. Étant donné qu'il n'est pas possible de dériver de longues chaînes de NC par l'APTS dans les milieux réactionnels décrits, nous avons voulu évaluer l'introduction d'une étape préalable de dépolymérisation partielle des NC en milieu acide avant leur dérivation, pour obtenir un mélange de composés de plus faibles masses moléculaires (typiquement, des oligomères de glucose plus ou moins nitrés, enchaînés en conformation $\beta(1\rightarrow4)$), c'est-à-dire, des cellodextrines) présentant une plus grande solubilité dans les milieux aqueux. L'introduction de cette étape devrait contribuer à améliorer le rendement global de dérivation des NC par l'APTS. Bien entendu, cette dépolymérisation ne devra pas être menée à son terme (c'est-à-dire, jusqu'au glucose), de façon à ce que la composition du mélange issu de cette dépolymérisation contienne encore de l'information quant à la NC de départ. Il

conviendra d'étudier en particulier dans quelle mesure cette dépolymérisation en milieu acide s'accompagne d'une réaction de dénitrification. En outre, nous avons cherché également à améliorer la résolution des profils électrophorétiques obtenus pour la NC et les hydrolysats de NC, dérivés par l'APTS, en utilisant un électrolyte à base d'acide ϵ -aminocaproïque. Enfin, pour donner tout son sens à ce travail, nous nous sommes efforcés d'identifier les produits obtenus après dépolymérisation des NC à l'aide d'étalons de cellodextrines et par spectrométrie de masse (collaboration avec le Dr Régis Daniel, Université d'Evry-Val-d'Essonne). A ce stade, il nous a semblé intéressant d'optimiser les conditions de dérivation par l'APTS des produits de dépolymérisation à partir d'étalons de cellodextrines. En retour, la méthode d'analyse par CE-LIF, une fois revisitée, pourra servir à optimiser les conditions de cette étape de dépolymérisation en milieu acide des NC. Néanmoins, nous avons jugé utile de développer en parallèle une nouvelle méthode d'analyse simultanée (par CE-UV), plus rapide et moins coûteuse que la CE-LIF, des 7 premiers oligomères de cellodextrines et de 8 carbohydrates (mono- ou disaccharides) susceptibles d'être retrouvés dans des matrices post-attentat.

CHAPITRE I : Obtention d'une empreinte de la nitrocellulose par électrophorèse capillaire après dépolymérisation en milieu acide et dérivation avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate

Capillary electrophoresis fingerprinting of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate derivatized nitrocellulose after partial acid depolymerization

Elodie Alinat^{1,2,3}, Nathalie Delaunay^{1,3}, Cédric Przybylski^{4,5}, Régis Daniel^{4,5}, Xavier Archer², Pierre Gareil^{1,3,6*}

¹ESPCI ParisTech, Laboratory of Analytical and Bioanalytical Sciences, and Miniaturization, 75005 Paris, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), Paris, France

³CNRS, UMR CBI 8231, Paris, France

⁴CNRS, UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry France

⁵Université Evry-Val-D'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry France

⁶Chimie ParisTech, 75005 Paris, France

Key words: *nitrocellulose fingerprints, capillary electrophoresis, 8-aminopyrene-1,3,6 trisulfonic acid, fluorescence detection, acid hydrolysis*

Abbreviations: 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (**APTS**), background electrolyte (**BGE**), capillary electrophoresis (**CE**), 2,5-dihydroxybenzoic acid (**DHB**), degree of substitution (**DS**), electroosmotic flow (**EOF**), hydroxypropyl methyl cellulose (**HPMC**), laser induced fluorescence (**LIF**), Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight (**MALDI-TOF**), Mass spectrometry (**MS**), nitrocellulose (**NC**)

Abstract

Fine characterization of nitrocellulose (NC) remains a challenge, especially in forensic analysis, and a strategy consisting in obtaining representative fingerprints by a separation technique, as for proteins, is of prime interest. In this work, we first established that NCs (especially of high molar mass) cannot be homogeneously derivatized by 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS), because of their poor

solubility in the medium required for APTS derivatization. Therefore, a partial acid depolymerization step was considered, prior to derivatization by APTS, in an attempt to generate a mixture of oligosaccharides retaining information on the initial NC sample and/or on the cellulose used to prepare it. Acid depolymerization conditions (time and acid concentration) as well as APTS derivatization conditions (time, temperature, APTS/NC and reducing agent/APTS molar ratios) were investigated for lowly-nitrated NCs. The best compromise between depolymerization yields, speed, and pertinency of the resulting oligosaccharidic mixture was obtained using fuming hydrochloric acid (37%, w/w) at 50°C for 30 min. The most effective procedure for APTS derivatization of neutral oligosaccharides obtained after partial acid depolymerization of NC was achieved at 70°C for 2 h. The resulting APTS-derivatized oligosaccharides were then separated by capillary electrophoresis (CE) using a background electrolyte composed of 60 mM 6-aminocaproic acid, pH 4.5 (adjusted with acetic acid) + 0.02% hydroxypropyl methyl cellulose. Finally, for the first time, they were identified using APTS-derivatized cellodextrin standards and by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

1. Introduction

Nitrocellulose (NC) is a nitrated ester polymer obtained by nitration of cellulose in nitric and sulfuric acid mixtures. Following to this esterification reaction, hydroxyl groups of cellulose are replaced by nitro groups with a maximum theoretical number of 3 nitro groups per glucopyranose unit [1,2]. Physical and chemical properties of NCs strongly depend on their nitrogen content and molar mass, and determine their industrial applications. Indeed, NCs with nitrogen content less than 12.5% are widely used as raw material in daily products (varnishes, paints, membranes), whereas highly-nitrated NCs (nitrogen content >12.5 %) are employed in explosive materials (smokeless gunpowders, and dynamites). The high molar mass, the inherent dispersity in both molecular and functional groups and the lack of solubility in common organic solvent presented by NC make its analysis particularly difficult. There is still a great demand on easy, safe, selective and sensitive methods to characterize them, especially for forensics. Vibrational spectroscopy [3,4], mass spectrometry [5-7], high-performance liquid chromatography [8-15], gas chromatography [16-20] and capillary electrophoresis [21,22] have all brought their contribution to NC analysis. As NCs retain the chemical properties of reducing carbohydrates, they can be characterized using analytical strategies dedicated to these. Capillary electrophoresis (CE) with its high separation efficiency, low reagent consumption, and speed appeared as an interesting alternative to chromatographic methods, especially for the analysis of small polymers [23]. One of the most widely applied methodology to analyze oligo-, or polysaccharides involves a reductive amination by a derivatization agent such as 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS), which imparts them with negative end-charge and fluorescent tag, enabling both their selective separation by CE, and sensitive laser-induced fluorescence (LIF) detection [24-35]. Recently, Fernández de la Ossa et al. reported on the CE-LIF analysis of NCs after direct APTS derivatization to discriminate NCs according to their nitrogen content [21,22]. The first method published by Fernández de la Ossa et al. proposes the visual discrimination of intact NCs on the basis of the obtained electrophoretic fingerprint [22]. The same group also used the fingerprints obtained by CE and chemometric tools (principal component analysis and soft independent modeling of class technology) to discriminate non-explosive (cigarettes, nail polishes and varnishes) and explosive (smokeless gunpowder) NC-based samples [21]. Nevertheless, we believe that the fingerprint strategy is well suited provided that it allows a structural identification of some diagnostic components. Moreover, weak signals corresponding to APTS-labeled NCs were obtained, which probably results from the low derivatization yields due to the poor solubility of NC in the derivatization and separation medium.

The aim of this work was to provide a deeper chemical understanding on the CE-LIF fingerprint of NCs obtained after APTS derivatization. Apart from the possibility of determining the nitrogen content

by this approach [21,22], which was certainly not the most appropriate for this goal, other information of forensic interest might be obtained such as on the presence of NC itself and the origin of the cellulose used to manufacture it, through a wary examination of the carbohydrate profile. This at least requires partial identification of peaks composing the fingerprint. To this end, a series of cellodextrin oligomers, which are composed of β (1-4)-linked glucopyranose units, exactly as in cellulose, was employed. First, to remedy the lack of NC solubility and to increase the obtained derivatization yields, a step of a partial acid depolymerization was introduced before NC derivatization by APTS. Next, to increase the derivatization yields, the effects of derivatization time, temperature, APTS/NC molar ratio, and reducing agent/APTS molar ratio were studied. This study was conducted with two non-explosive NC standards having different molecular masses. Then, for the first time, the resulting APTS-derivatized oligosaccharides were identified in the electrophoretic fingerprint using APTS-derivatized cellodextrin standards, and off-line by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

2. Materials and methods

2.1. Standards and electrolytes

The NC standard with nitrogen content of 11.14% (NC1, DS = 2.0, M_w = 20,000 g mol⁻¹) was provided by the Central Laboratory of Police Prefecture (Paris, France). The NC sample with a nitrogen content of 12.0% (NC2, DS = 2.3, M_w = 312,000 g mol⁻¹) was purchased from Dow Chemical (Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Germany). NCs were received with an ethanol content of approximately 30%.

6-Aminocaproic acid (> 99%), glacial acetic acid (> 99%), and hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC, viscosity of 2% aqueous solutions at 20°C, approximately 4,000 Pa s) from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) were employed for electrolyte preparations. 8-Aminopyrene-1,3,6 trisulfonic acid trisodium salt (APTS, suitable for fluorescence, > 96%), and sodium cyanoborohydride (reagent grade 95%) used for derivatization were obtained from Sigma. Concentrated volumetric solutions (Convol Normadose) of 1 M sodium hydroxide were used to neutralize the hydrolysates. Cellobiose (99.2%, 342.3 g/mol), cellotriose (97.3%, 504.4 g/mol), cellotetraose (97.3%, 666.6 g/mol), cellopentaose (97.5%, 828.7 g/mol), cellohexaose (89%, 990.9 g/mol), and celloheptaose (80%, 1153.0 g/mol) were supplied by Elicityl (Crolles, France). D-(-) Glucose (< 99.5 %) was from Sigma.

Fuming hydrochloric acid for analysis (37%, w/w) and THF (\geq 99.8%) from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) were used for the acid depolymerization and derivatization of NC, respectively.

Stock solutions of glucose at 10 g L⁻¹ and of cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose at 1 g L⁻¹ were prepared by dissolving the appropriate amount in water and stored at 4°C.

2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and methanol for MALDI-TOF MS were purchased from Sigma-Aldrich and VWR, respectively. Ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France) was used throughout.

2.2. Instrumentation

All NC standards were dried with an oven (model UNB100) from Memmert (Schwabach, Germany) to remove damping agent. All CE separations were performed with an Agilent Technologies HP 3D system (Massy, France) equipped with a laser-induced fluorescence detector. Fluorescence excitation radiation was obtained from the 488 nm output of a 4-mW argon-ion laser (Model 85-BCD-020-230, Melles Griot, Voisins-Le-Bretonneux, France) coupled to a Zetalif Evolution LIF detector (Picometrics, Toulouse, France) with a high-pass fluorescence emission filter at 520 nm. A rise time of 0.05 s and a photomultiplier voltage of 650 V were chosen. Data processing and acquisition were performed using Chemstation software (Agilent Technologies). Depolymerization and derivatization experiments were performed with a block heater (SBH 130D) from Stuart (Staffordshire, UK) capable of receiving thirty 1-mL microtubes.

MALDI-TOF MS experiments were performed using a Perseptive Biosystems Voyager-DE Pro STR (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA). This instrument was equipped with a nitrogen UV laser ($\lambda = 337$ nm) pulsed at a 20 Hz frequency. The mass spectrometer was operated in the positive and negative ion reflector modes with an accelerating potential of +/- 20 kV and a grid percentage equal to 70%. Mass spectra were recorded with the laser intensity set just above the ionization threshold (2800 in arbitrary units), extraction delay was set to 300 ns and mass spectra were obtained by accumulation of 200 laser shots and processed using Data Explorer 4.0 software (Applied Biosystems). The instrument was calibrated using standard peptide mixtures provided by the manufacturer.

2.3. Electrophoretic procedures

Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with dimensions of 65 cm (48.5 cm to the detector) \times 50 μ m i.d \times 365 μ m o.d were used for all CE separations. Before first use, capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, and finally background electrolyte (BGE), each under 935 mbar for 10 min (15 capillary volumes). The optimized BGE consisted of 60 mM 6-aminocaproic acid, pH 4.5 (adjusted

with acetic acid) + 0.02% hydroxypropyl methyl cellulose. Between each run, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH under 935 mbar for 10 min (15 capillary volumes) followed by the BGE under 935 mbar for 10 min (5 capillary volumes). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 10 s (about 1% of the capillary volume). The applied voltage was -30 kV (reversed polarity) and the capillary cartridge was thermostated at 25°C. Inlet BGE was replaced between each run whereas outlet BGE was daily changed. After the last analysis of the day, capillary was rinsed with water under 935 mbar for 15 min (22.5 capillary volumes). Capillaries were stored in water when not in use.

2.4. Depolymerization of NC

About 15 mg of dried NC were placed in a 10-mL glass tube and subjected to acid depolymerization. To this aim, 1 mL of fuming hydrochloric acid was added into each tube containing NCs and the tubes were screw-capped. The stopped tubes were next placed in the block heater for a fixed time at 50°C. The tubes were then placed into an ice bath to stop depolymerization at the fixed time. The depolymerization was further stopped by adding 2.39 mL of 5 M NaOH, to reach pH values within the range 2.0 -2.5.

2.5. Derivatization of intact NC (without preliminary depolymerization step)

NCs were placed in a 1-mL microtube and fluorescently labeled with 8-aminopyrene-1,3,6 trisulfonic acid by reductive amination. Therefore, about 210 µL of 0.019 M APTS solution in 15% (v/v) acetic acid (pH 2.2) and 80 µL of 1 M NaBH₃CN in THF were added to 4.0 mg of dried NC. Derivatizations were performed at 70°C for 2 h. The resulting reaction mixtures were diluted with ultra-pure water to 500 µL and diluted again 10 fold prior to CE-LIF analysis. The samples should be kept protected from exposure to light.

2.6. Derivatization of NC after depolymerization step

After acid depolymerization, the obtained oligomers were converted into fluorescent derivatives. To this end, 20 µL of the hydrolysates were transferred into microtubes and 5.84 µL of 0.019 M APTS solution in 15% (v/v) acetic acid and 1.95 µL of 1 M sodium cyanoborohydride in THF were added. Then, the reaction mixtures were incubated at 70°C for 2 h. The labeling reactions were stopped by the addition of 30 µL of ultra-pure water. Prior to CE-LIF analysis, samples were diluted 10 times with ultra-pure water.

2.7. Derivatization of cellodextrin standards

A mixture containing 150 nmol of glucose, 7.25 nmol of cellobiose, 5 nmol of cellotriose, 3.75 nmol of cellotetraose, 2.75 nmol of cellopentaose, 2.5 nmol of cellohexaose, and 2.2 nmol of celloheptaose (2.5 µL of each stock solution) was derivatized by the addition of 182.5 µL of 0.019 M APTS solution in

15 % (v/v) acetic acid and 69.4 μL of 1 M sodium cyanoborohydride in THF. These conditions correspond to a cyanoborohydride-to-APTS molar ratio of 20 and to a molar ratio of APTS to total cellodextrin of 20. For varying these ratios, the added volumes of APTS and cyanoborohydride solutions were varied accordingly. The derivatization reaction was allowed to proceed at 70°C for 2 h. The samples should be kept protected from exposure to light. After completion of labeling and before CE-LIF analysis, the mixture was diluted 50-fold with ultra-pure water.

2.8. MS procedures

Intact and partially hydrolyzed NC samples were directly mixed at a 1/1 (v/v) ratio with DHB at 20 mg/mL in methanol/water 1/1 (v/v) as matrix. 1 μL of the mixture was next deposited on a MALDI stainless steel plate.

3. Safety considerations

NC in dry state is a highly flammable solid that ignites easily and burns explosively when is concealed. This is why it should always be stored wet. NC can be ignited by flame, heat, shock, friction, sparks or static electricity. The oven door opening and closing system was modified to prevent confinement in case of explosion. Special attention was paid to keep NC samples wet when stored in a refrigerator and to weigh them after drying in the desiccator to avoid any shock. Security glasses and protection clothes were worn by the operator. In addition, weighing of dry matter was always performed under the assistance of a person equipped with a water vaporizer to prevent from any fire start. Special attention should be also taken during the depolymerization step with fuming hydrochloric acid at 50 °C. Working with 15 mg dry matter considerably reduces hazard risks.

4. Results and discussion

4.1. Optimization of CE separation conditions

The derivatization of neutral carbohydrate oligomers with a charged fluorophore like APTS provides them with a charge and enhances their detection sensitivity. Consequently, rather strong electrophoretic mobilities are imparted to the APTS-oligomers toward the anode by the three negatively charged sulfonate end groups supplied by the derivatization agent. As these electrophoretic mobilities are higher than the cathodic electroosmotic mobility existing inside bare fused-silica capillaries under most common conditions, negative polarity should be applied to the capillary inlet. Thus, the migration order of APTS-oligomers to the detector is the decreasing order of their electrophoretic mobilities, depending on their charge-to-mass ratio. The higher the degree of

polymerization is, the lower the electrophoretic mobility. For APTS-derivatized cellodextrins that were used as model compounds to identify the peaks constituting the APTS-derivatized acid-hydrolysates of NCs, the sequence in order of increasing migration time is cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose. APTS-glucose is detected in the time frame of the degradation products of APTS.

A method for the fingerprinting of APTS-labeled NCs was developed by Fernández de la Ossa et al. [22]. Consequently, the BGE developed by Fernández de la Ossa et al., which consists in 1 M formic acid, pH 2.0, was first used for the separation of the APTS-labeled NC1 and APTS-cellodextrins. A representative electrophoregram of APTS-labeled NC1 under these conditions is presented in Figure III-I-1a, revealing poorly resolved peaks. Thus, some modifications of the separation conditions were investigated to improve resolutions. To this end, separations were next performed under the conditions developed by Gennaro et al. [36] for APTS-labeled glycans, which can be nicely separated in polyvinyl alcohol-coated capillaries with a BGE composed of 40 mM 6-aminocaproic acid at pH 4.5 (adjusted with glacial acetic acid) + 0.02% (w/w) HPMC. HPMC was added to the BGE to markedly reduce the EOF, resulting in a reduction by 50 % of the analysis time. The qualitative composition of this BGE was thus retained for this study. Then, the effect of 6-aminocaproic acid concentration on the electrophoretic separation of the APTS-NC1 oligomers was studied. As expected, the resolution was enhanced by an increase in 6-aminocaproic acid concentration. The best final separation conditions were obtained with a 60 mM 6-aminocaproic acid adjusted to pH 4.5 with glacial acetic acid + 0.02% HPMC with a 65 cm long capillary (48.5 cm to the detector), and a temperature set at 25°C. The maximum voltage that can be applied under these conditions without noticing detrimental effect of Joule heating was -30 kV. Samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection for 10 s under 50 mbar, which represents a sample volume of the order of 1% of capillary volume. Between each analysis, the capillary was rinsed under 935 mbar for 10 min with 0.1 M sodium hydroxide solution to prevent from APTS adsorption to capillary silica walls. In effect, unreacted APTS was present at high concentration in the sample matrices. A typical electrophoregram obtained under these conditions is presented in Figure III-I-1b.

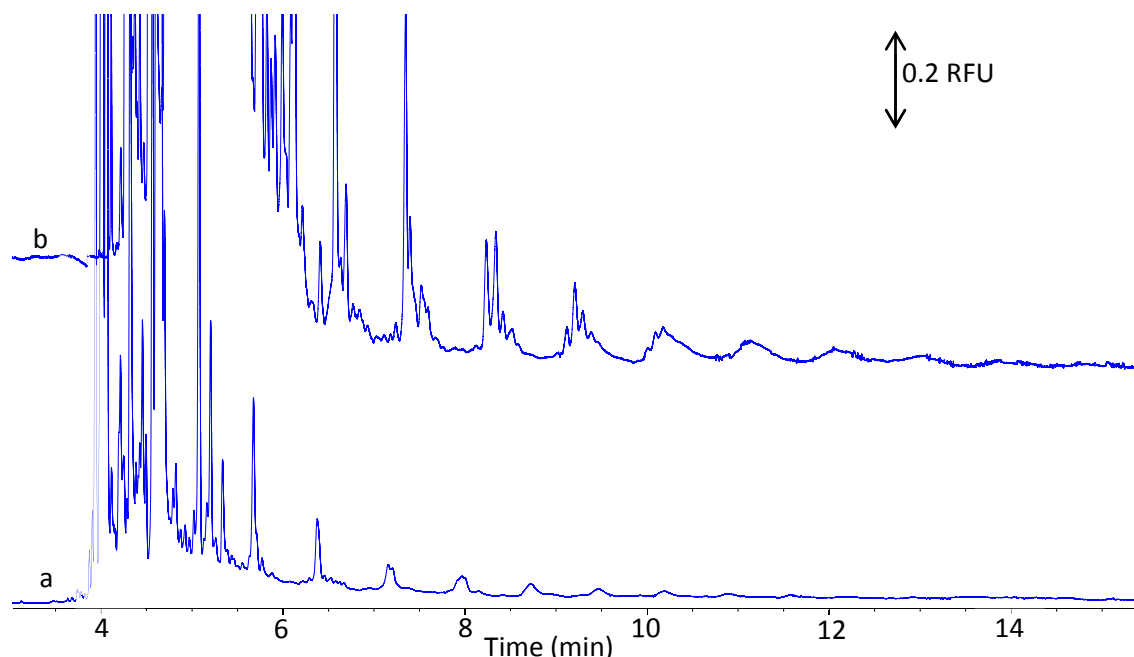


Figure III-I-1. CE-LIF electrophoregrams of APTS-labeled intact nitrocellulose NC1 (without acid depolymerization before labeling) obtained (a) under the conditions developed by [22] and (b) under improved separation conditions, adapted from [36]. Bare-fused silica capillary, 50 μm ID \times 65 cm (detection at 48.5 cm); BGE: (a) 1 M formic acid, pH 2.0 and (b) 60 mM 6-aminocaproic acid adjusted to pH 4.5 by glacial acetic acid + 0.02% (w/w) HPMC; temperature: 25°C; applied voltage: -30 kV; hydrodynamic injection, 50 mbar, 10 s; NC1 concentration: 0.8 mg/mL; detection: LIF, $\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm, fluorescence emission collected at 520 nm. Derivatization conditions: see § III-I-2.5.

Applying these conditions, outstanding separation efficiencies, in excess of 500 000 theoretical plates, were obtained, as can be noted in Table III-I-1. These figures are actually consistent with theoretical expectations, which predict plate numbers close to one million for analytes having molar weight of 1000-1600 g/mol, assuming diffusion-limited band broadening, and estimating diffusion coefficients by Wilke-Chang equation [37]. The difference between experimental and calculated plate numbers can be attributable to additional sources of band broadening, especially the finite length of the injection plug.

Repeatabilities on migration times, normalized migration times, corrected peak areas and normalized corrected areas are given in Table III-I-1 for a standard mixture of APTS-cellodextrins at 0.5 mg L⁻¹ each in 1 M NaCl to reproduce the derivatization medium of NC depolymerizates. APTS-celloheptaose was used as internal standard to normalize migration time and peak areas. The RSDs on normalized migration times and normalized corrected areas were in the range of 0.01 to 0.09% and 1.3 to 3.4%, respectively.

Table III-I-1: Peak efficiencies and repeatabilities on migration times, normalized migration times, corrected peak areas, and normalized corrected areas for a mixture of APTS-labeled cellodextrins. APTS-celloheptaose was used as internal standard to normalize peak areas and migration times. Electrophoretic conditions: see § III-I-2.3. Derivatization conditions: see § III-I-2.7. Efficiencies are expressed in plate numbers (N), calculated manually from peak width at half peak height.

Cellodextrins	N (10 ⁵)	Migration times RSD (%) (n = 6)	Normalized migration times RSD (%) (n = 6)	Corrected areas RSD (%) n = 6)	Normalized corrected areas RSD (%) (n = 6)
Cellobiose	5.7	1.1	0.09	2.7	1.3
Cellotriose	5.5	1.0	0.06	2.7	2.1
Cellotetraose	6.4	1.0	0.05	1.8	1.7
Cellopentaose	6.4	1.0	0.04	1.6	1.9
Cellohexaose	5.6	1.0	0.01	2.6	3.4
Celloheptaose	5.4	1.1	-	3.5	-

4.2. Optimization of the derivatization conditions

The two-step reactional scheme of the derivatization reaction (reductive amination) of reducing carbohydrates can be found in [38]. In order to get the highest and most reproducible derivatization yields for NCs with APTS, a standard cellodextrin mixture (DP3-DP7 each at 0.05 g L⁻¹ in ultra-pure water) was used as model sample and the effects of derivatization time, temperature, pH, APTS/cellodextrins molar ratio, and reducing agent/APTS molar ratio were investigated, using the optimized CE separation conditions. The upper and lower values for each parameter were chosen according to the data collected in literature for glycan analysis [24-35,39-49]. Derivatization time was varied between 1 h and 6 h. Indeed, according to literature, a minimum time of 1 h was necessary to convert oligosaccharides into fluorescent derivatives and derivatization time greater than 6 h did not appear reasonable for practical analytical reasons. For temperature, the low and high values were fixed at 30 and 80°C, respectively. The effect of the nature of the acid catalyst used for the APTS derivatization was also considered. Acetic and citric acids, having pKa values of 4.76 and 3.13 (25 °C), respectively, were used as catalyst for reductive amination [24]. Derivatization experiments were performed at pH 1.4 and 2.2. Higher labeling yields were obtained at pH 2.2. No further increase in the labeling yield was obtained by replacing acetic acid by citric acid at the same pH (results not shown). Consequently, acetic acid was selected for this study. The APTS/cellodextrins molar ratio was varied between 1 and 50. The use of a large excess of APTS led to a significant amount of unreacted APTS in the reaction mixture at the end of the labeling reaction, that may affect the analysis of the shortest oligomers (like glucose or cellobiose), as their peaks can be hidden by the large APTS peak. Finally, NC derivatizations were carried out by varying the reducing agent/APTS molar ratio between 5 and 50.

Indeed, an excess of reducing agent is necessary to reduce the Schiff base formed during the first derivatization step into a more stable secondary amine. Higher molar ratio led to the formation of numerous fluorescent degradation products of APTS, interfering with the separation of oligomers. Eventually, in the absence of available data pertaining to cellobioses, a monovariate experimental study was undertaken.

The effect of the APTS/cellodextrins molar ratio on the corrected peak areas obtained by CE-LIF at 70°C after 4 h reaction with a molar ratio of NaBH₃CN to APTS equal to 17.5 is presented in Figure III-I-2.

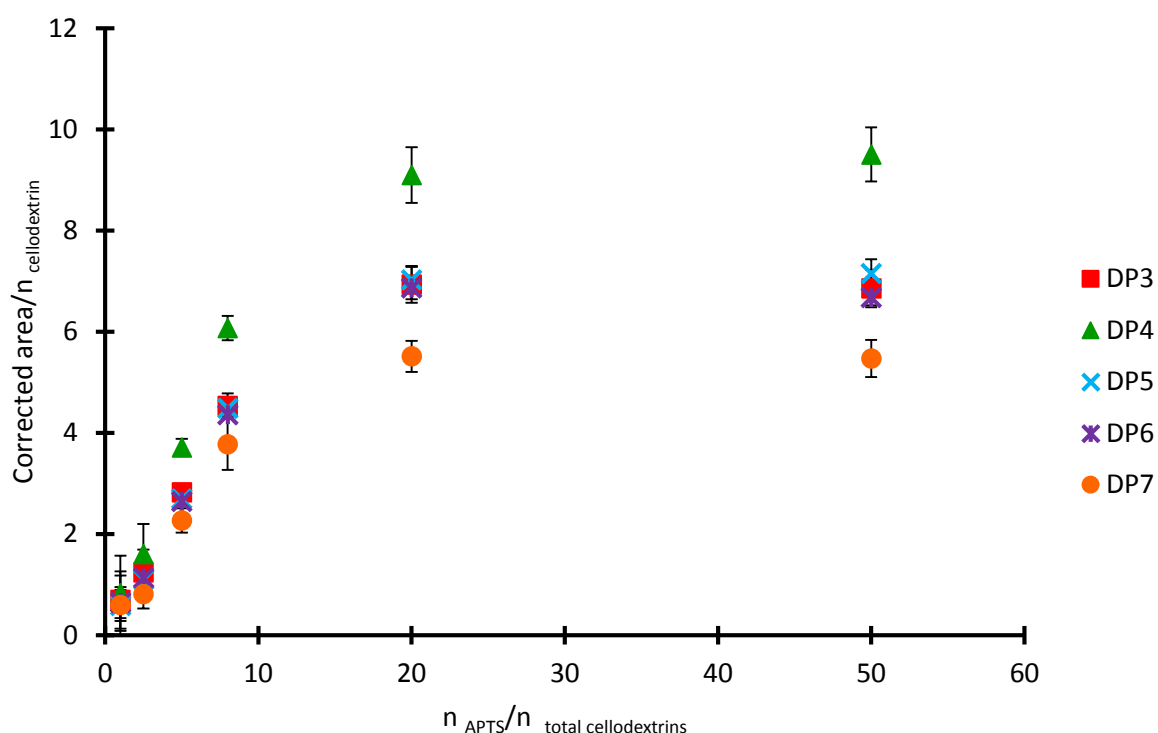


Figure III-I-2. Effect of the molar ratio of APTS to total cellodextrins on APTS labeling of a standard mixture of cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose in molar proportions 2.29/1.73/1.39/1.16/1. The corrected peak area divided by each cellodextrin concentration is plotted on the Y-axis, in arbitrary units. Derivatization conditions: see § III-I-2.7, unless otherwise specified below: temperature: 70°C; duration: 4 h; molar ratio of NaBH₃CN to APTS: 17.5. CE conditions: see Figure III-I-1b. Error bars represent RSD (n = 3).

As the cellodextrins were derivatized by APTS in mixture, the corrected peak areas obtained for each cellodextrin were normalized by the concentration of each respective cellodextrin. For all cellodextrin standards, the amount of APTS-derivatized cellodextrins increased markedly upon increasing the APTS/cellodextrins molar ratio within the range 1-20, whereas only a slight increase in the derivatization yields were observed on increasing the APTS/cellodextrins ratio beyond 20. As expected, for all cellodextrins, a saturation type curve was obtained, displaying a plateau above an APTS/cellodextrins molar ratio equal to 20. The different plateau levels obtained for the various

cellodextrins can be explained by differences in reactivity of the cellodextrin oligomers with respect to APTS. Based on the results presented in Figure III-I-2, an APTS/cellodextrins molar ratio of 20 was selected as optimum to get maximum derivatization yields while minimizing the amount of APTS, which is highly expensive.

The effect of derivatization time on corrected peak areas of each APTS-derivatized cellodextrin normalized by each cellodextrin concentration was studied within the range of from 1 to 6 h, at 70°C with an APTS/cellodextrins molar ratio of 20, and a NaBH_3CN /APTS molar ratio of 17.5. As shown in Figure III-I-3, the amount of APTS-derivatized cellodextrin increased slightly upon increasing the reaction time up to 2 h, while no further significant increase in derivatization yield is obtained from 2 to 6 h. Consequently, a reaction time of 2 h was chosen as optimum derivatization time.

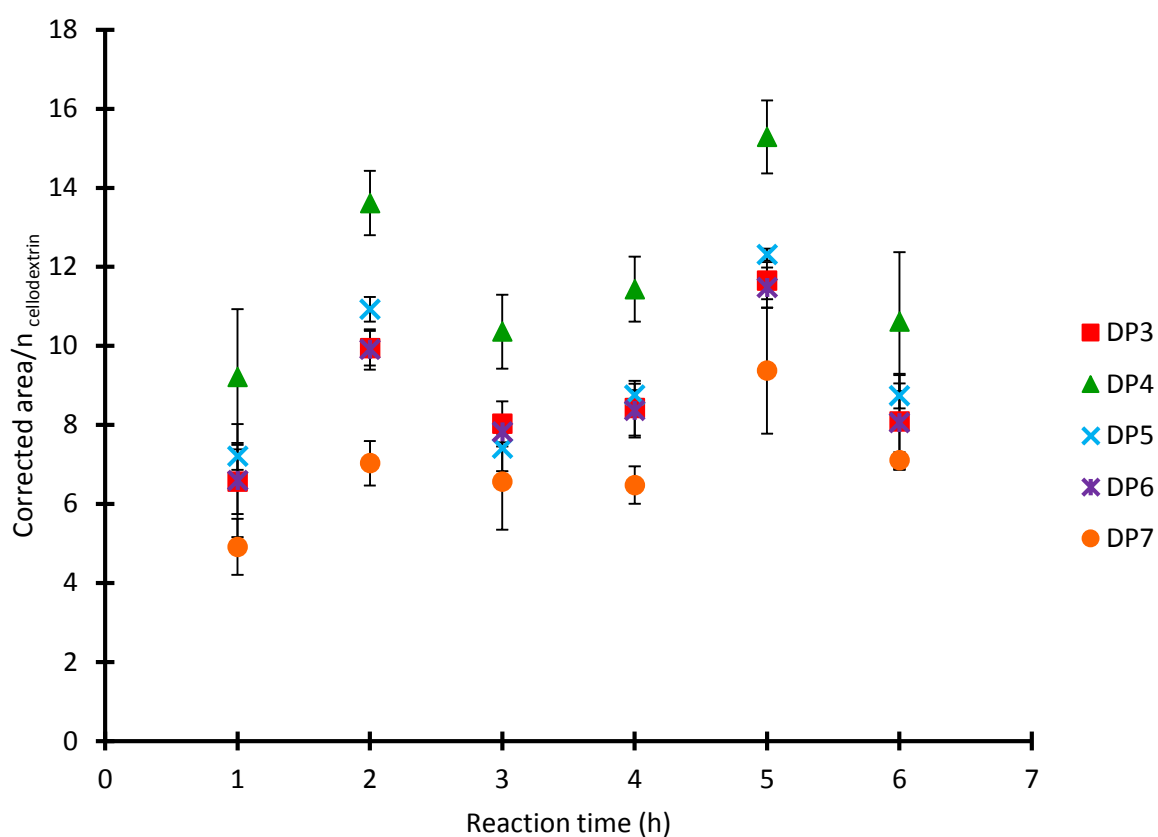


Figure III-I-3. Effect of derivatization time on APTS labeling of a standard mixture of cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose in molar proportions 2.29/1.73/1.39/1.16/1. The corrected peak area divided by each cellodextrin concentration is plotted on the Y-axis, in arbitrary units. Derivatization conditions: see § III-I-2.7, unless otherwise specified below: temperature: 70°C; molar ratio of APTS to total cellodextrins: 20; molar ratio of NaBH_3CN to APTS: 17.5. CE conditions: see Figure III-I-1b. Error bars represent RSD ($n = 3$).

Figure III-I-4 shows the effect of the NaBH_3CN /APTS molar ratio on APTS labeling of each cellodextrin obtained after reaction at 70°C for 2 h, with an APTS/cellodextrins molar ratio equal to 20.

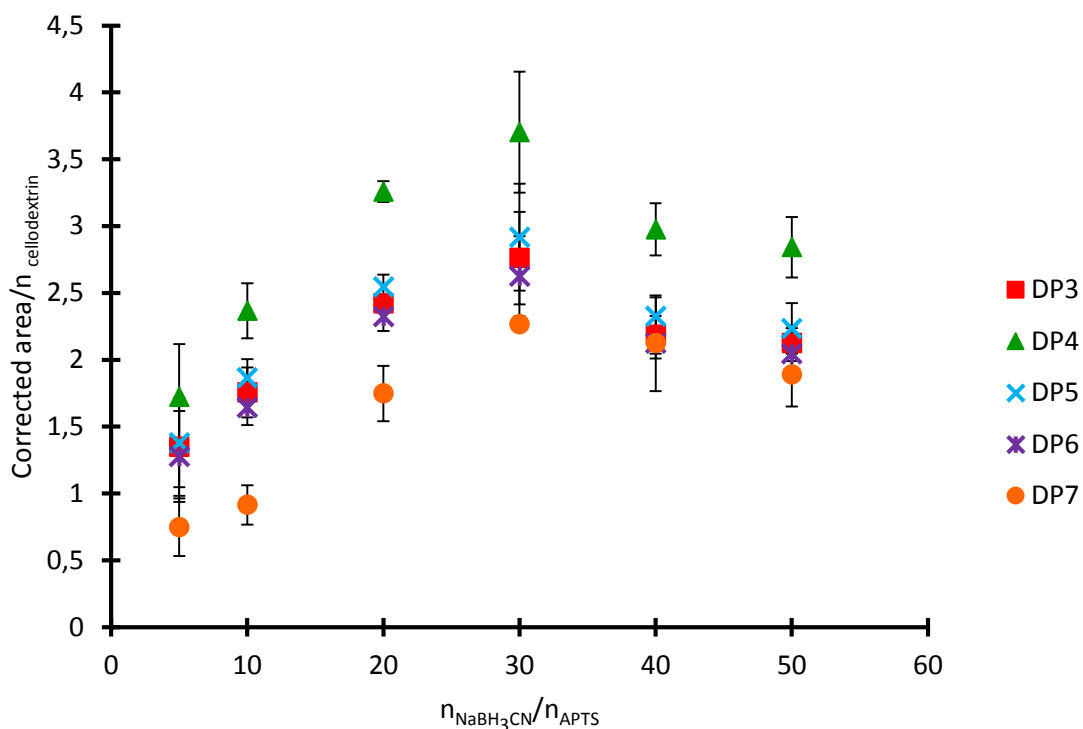


Figure III-I-4. Effect of the molar ratio of NaBH_3CN to APTS on APTS labeling of a standard mixture of cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose in molar proportions 2.29/1.73/1.39/1.16/1. Derivatization conditions: see III-I-§ 2.7, unless otherwise specified below: temperature: 70°C ; duration: 2 h; molar ratio of APTS to total cellodextrins: 20. CE conditions: see Figure III-I-1b. Error bars represent RSD ($n = 3$).

On increasing the NaBH_3CN /APTS molar ratio, for all the studied cellodextrins, the derivatization yield increases up to a NaBH_3CN /APTS molar ratio of 20, beyond which a plateau is reached, indicating that the maximum yield is achieved. Therefore, a NaBH_3CN /APTS molar ratio of 20 was retained in the following of this study.

To investigate the effect of temperature on APTS labeling, the standard cellodextrin mixtures was incubated for 2 h with an APTS/cellodextrins molar ratio of 20 and a reducing agent/APTS molar ratio of 20 at temperature ranging from 30 to 80°C . The extend of the APTS labeling under these conditions is depicted in Figure III-I-5.

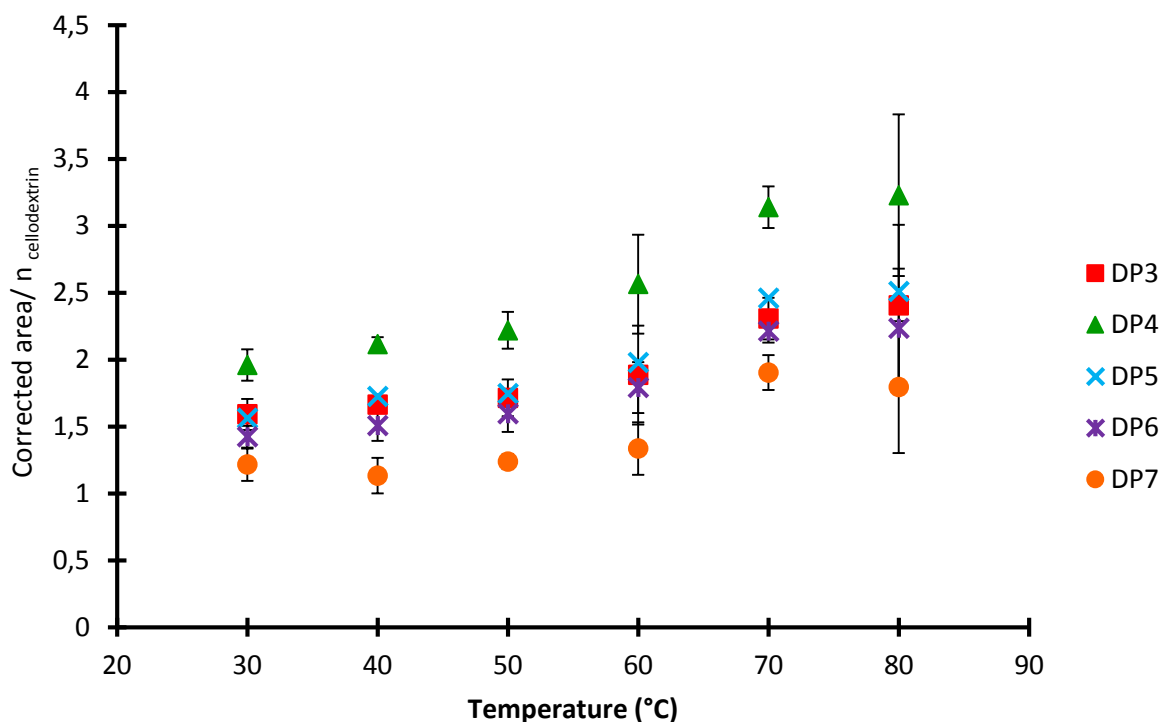


Figure III-I-5. Effect of temperature on APTS labeling of a standard mixture of cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose in molar proportions 2.29/1.73/1.39/1.16/1. Derivatization conditions: see § III-I-2.7, unless otherwise specified below: duration: 2 h; molar ratio of APTS to total celldextrins: 20; molar ratio of NaBH_3CN to APTS: 20. CE conditions: see Figure III-I-1b. Error bars represent RSD ($n = 3$).

As shown, derivatization speed is increased up to a temperature of 70 °C, which indicates that for this temperature equilibrium is reached after 2 h incubation. Therefore, 70°C was chosen subsequently as labeling incubation temperature for the derivatization of celldextrins. Eventually, the whole obtained experimental results demonstrate that the most effective conditions for the labeling reaction involve heating the reactional mixture at 70°C for 2 h at pH 2.2 using acetic acid as catalyst with an APTS/celldextrin molar ratio of 20 and a reducing agent/APTS molar ratio of 20.

4.3. Application to fingerprinting of intact NCs

First experiments on NC derivatization were carried out without acid depolymerization step. As an example, an electrophoretic profile obtained after derivatization of intact NC1 under the most effective conditions for the labeling reaction is presented in Figure III-I-6a.

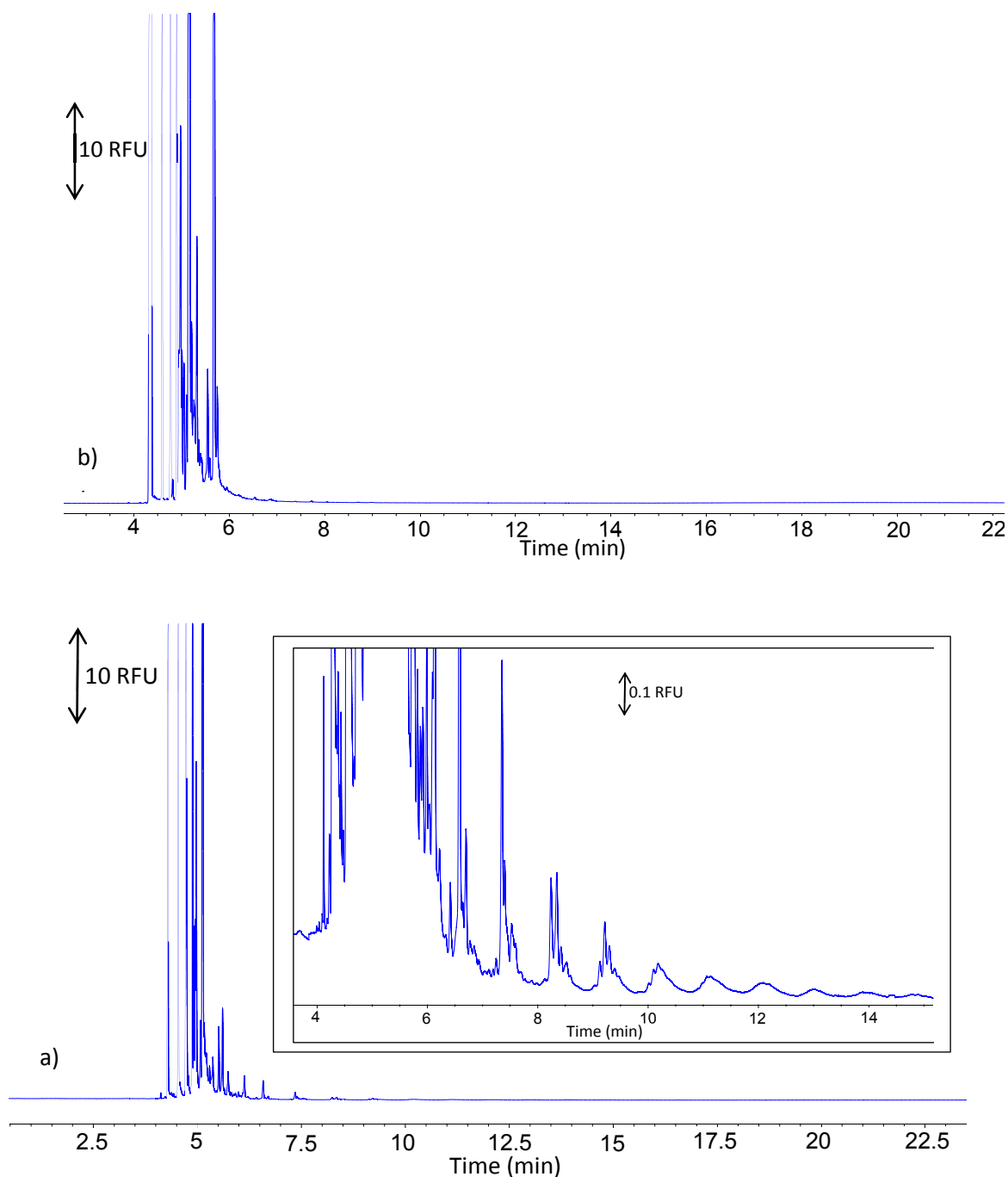


Figure III-I-6. CE-LIF electrophoregrams of (a) APTS-labeled intact nitrocellulose NC1 at 0.8 mg/mL (without acid depolymerization before labeling) obtained with a molar ratio of APTS to NaBH_3CN of 20 after heating at 70°C for 2 h, and (b) a blank containing the same initial concentrations of APTS and NaBH_3CN submitted to the same conditions. In both assays, the reaction was stopped by the addition of water to 500 μL , and then again diluted 10-fold with water prior to CE-LIF analysis. Derivatization conditions: see § III-I-2.5. CE conditions: see Figure III-I-1b.

Figure III-I-6b shows a blank containing a mixture of APTS and NaBH_3CN in the same molar ratio of APTS to NaBH_3CN (20) after heating at 70°C for 2 h. As expected, unreacted APTS, its impurities, and their degradation products appear as strong signals within the 4-6 min time frame. These signals are also recognized in the profile of NC1, along with later detected additional peaks, which are

representative of APTS-labeled NC1. A typical profile exhibiting repeating patterns was obtained, as expected for a polymer. Nevertheless, few signals, having low intensities, were obtained for APTS-labeled NCs and it can be anticipated that only the most soluble shortest oligomeric chains within the size-polydisperse NC samples can be observed. In 2012, Fernández de la Ossa et al. [22] claimed that the electrophoretic profiles obtained by CE-LIF allow the visual discrimination of NCs according to their nitrogen content. According to the authors, the time corresponding to the latest detected electrophoretic signals and the time interval between peaks are characteristic of a given nitrogen content. For NCs contained in collodions, higher peak time intervals were obtained ($\Delta t \approx 0.9$ min) than for highly-nitrated NCs contained in gunpowders ($\Delta t \approx 0.7$ min). Contrary to what was expected from that work, the electrophoretic profile obtained for non-explosive NC1 under the electrophoretic conditions advocated by those authors presents a peak time interval of 0.7 min (result not shown). Furthermore, without an acid depolymerization step, no signal representative of the APTS-NC was noticed for APTS-labeled NC2, having a molar mass of 312 000 g/mol, as shown in Figure III-I-7a.

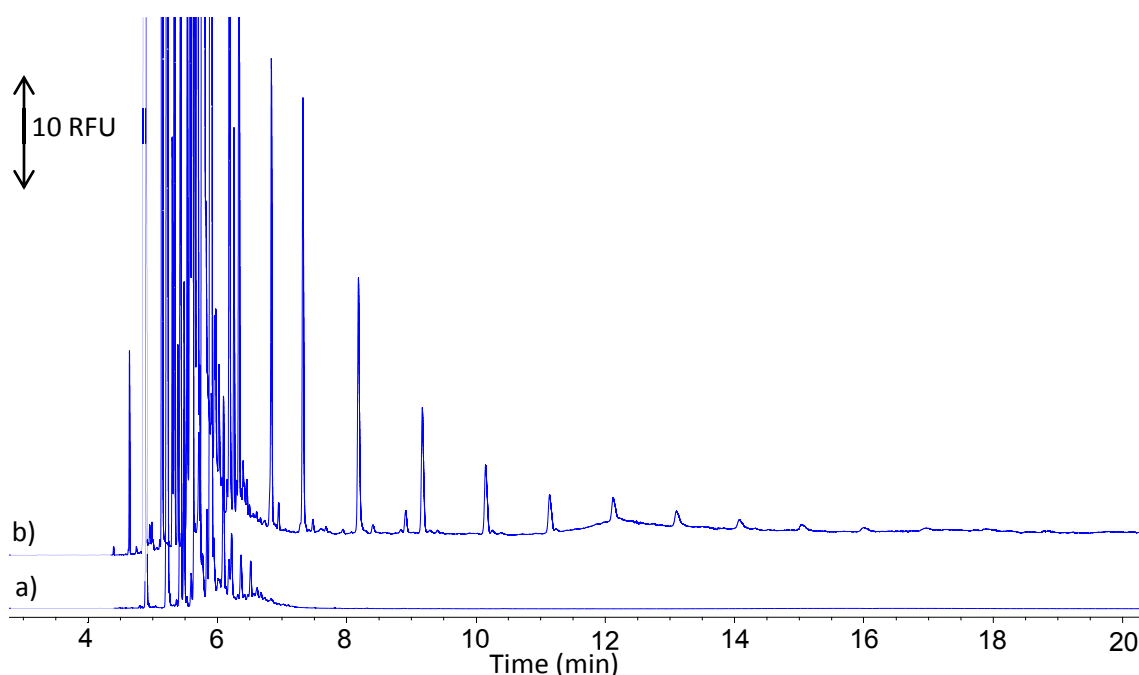


Figure III-I-7. CE-LIF electrophoregrams of (a) APTS-labeled intact nitrocellulose NC2 (without acid depolymerization before labeling) at 0.8 mg/mL, and (b) APTS-labeled nitrocellulose NC2 obtained after acid depolymerization (50 °C, 30 min) at 0.15 mg/mL. Acid depolymerization conditions: see § III-I-2.4. Derivatization conditions: see § III-I-2.5 for intact NC2 and § III-I-2.6 for depolymerized NC2. CE conditions: see Figure III-I-1b.

In effect, NCs with high molar masses cannot be derivatized by APTS because of their poor solubility in the derivatization medium and in the BGE. Thus, when some fingerprint is observed for a peculiar NC sample, this fingerprint cannot be considered representative of the whole NC sample, because of its size polydispersity, and any attempt of quantitative interpretation of results should be

biased. Eventually, contrary to the results reported by Fernández de la Ossa et al. [21,22], the APTS-labeled NC fingerprints obtained without any prior depolymerization cannot be used to discriminate NCs according to their nitrogen content.

4.4. NC fingerprinting after acid depolymerization

4.4.1. Depolymerization conditions

Due to the insolubility of intact NCs in the derivatization medium composed of acetic acid and THF, and afterwards in the aqueous BGE during the electrophoretic analysis, acid depolymerization step was investigated to allow analyte solubility at the early stage of derivatization, and hence greatly increase derivatization reaction yield, and representativity of the derivatized products with respect to the initial sample. The NC solubility depends on its substitution degree and its molar mass. Solubility decreases when the nitrogen content and the molar mass increase. Moreover, the reaction between a multicharged derivatizing agent and a reducing carbohydrate is suitable for the analysis of oligo/polysaccharides but inadequate for intact polymer having molar mass as high as hundreds of thousands [46]. Kim et al. reported that NC can be converted into glucose using highly-concentrated hydrochloric acid, thus achieving both denitration and depolymerization [50]. Therefore, hydrochloric acid was used in this work to partially depolymerize NC, in an attempt to retain some information on the initial NC composition and structure. The temperature was fixed at 50°C to ensure safe conditions, because higher temperatures may lead to an increase in the pressure inside the stopped tubes used for the assay. To evaluate the influence of hydrochloric acid concentration on NC depolymerization, experiments were carried out with non-explosive nitrocelluloses NC1 and NC2 with hydrochloric acid concentration ranging from 24% to 37% (w/w). No signal was obtained with acid concentration below 37%. So, fuming hydrochloric acid (37%, w/w) was selected. The influence of depolymerization time on the composition of the oligomeric mixture was also studied for both NC samples between 20 and 60 min. Table III-I-2 outlines the number of oligomeric patterns that can be assigned to both NCs according to depolymerization time.

Table III-I-2: Number of oligomeric patterns assigned to nitrocelluloses NC1 and NC2 according to depolymerization time.

Depolymerization time (min)	Number of peaks for NC1	Number of peaks for NC2
20	10	9
30	13	14
40	12	14
60	7	9

Finally, the best compromise between depolymerization yields, speed, and pertinency of the resulting oligosaccharidic size distribution was obtained using fuming hydrochloric acid (37 %, w/w) at 50°C for 30 min.

4.4.2. NC fingerprints

Figure III-I-7b shows the CE-LIF electrophoregram obtained from NC2 having a high-molar mass (312 000 g/mol) after partial acid depolymerization for 30 min at 50 °C. A comparison with the one obtained without acid depolymerization before labeling (Figure III-I-7a) clearly showed that an acid depolymerization step is needed to get an actual CE-LIF fingerprint of such NC. While no characteristic signal demonstrating the presence of a polysaccharide was observed without acid depolymerization (Figure III-I-7a), repetitive units likely corresponding to different DPs are detected in Figure III-I-7b, which might be characteristic of a given NC.

Similarly, Figure III-I-8a shows the CE separation of the mixture of the APTS-derivatized oligomers resulting from partial acid depolymerization of NC1 under the same conditions as before for NC2.

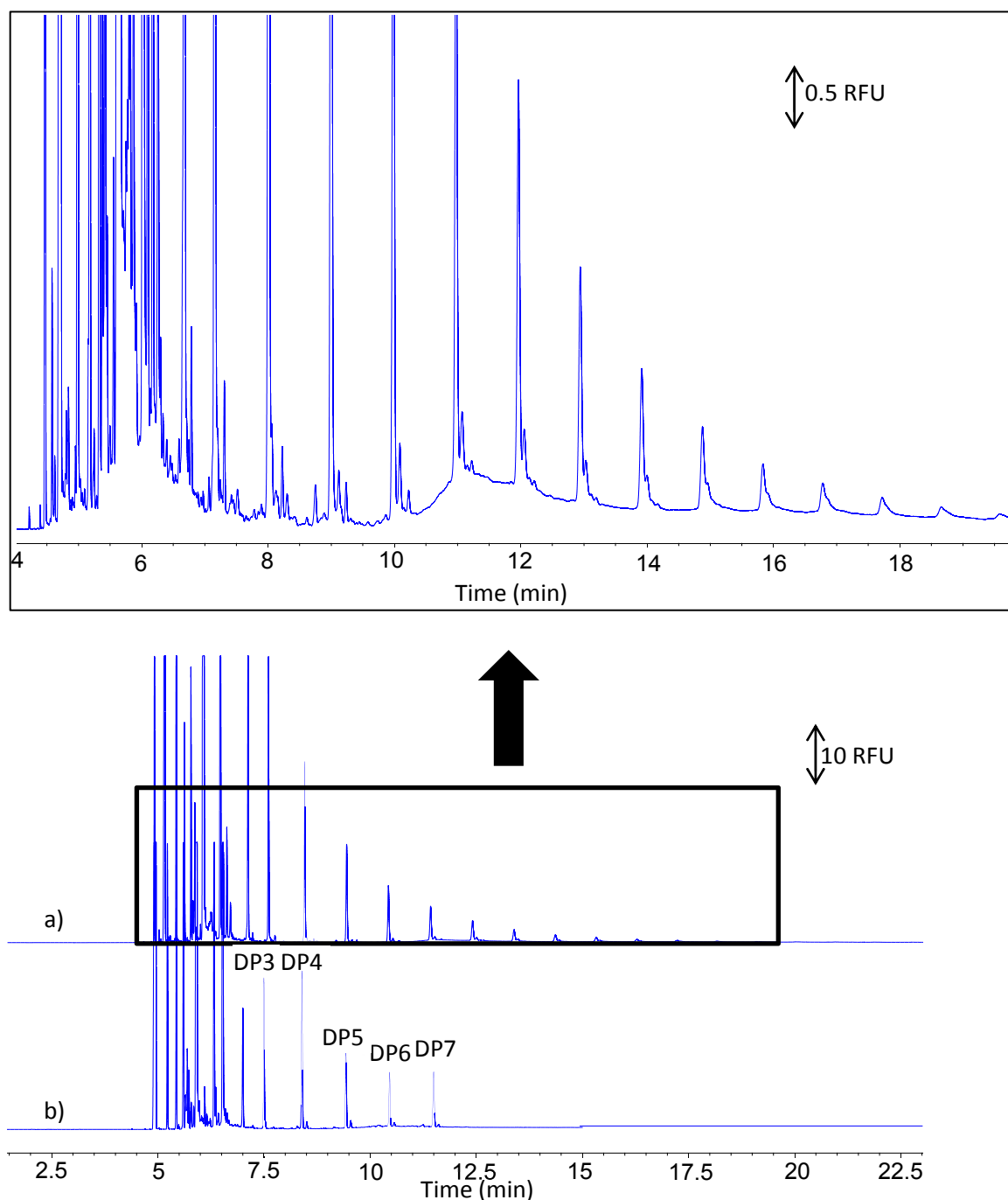


Figure III-I-8. CE-LIF electrophoregrams of (a) an APTS-labeled NC1 at 0.15 mg/mL (7.5 μ M) obtained after acid depolymerization (50 $^{\circ}$ C for 30 min), and (b) an APTS-labeled DP3-DP7 cellodextrin standard mixture in molar proportions 2.29/1.73/1.39/1.16/1. DP7 concentration: 0.16 μ M. Identification: cellotriose (DP3), cellotetraose (DP4), cellopentaose (DP5), cellohexaose (DP6) and celloheptaose (DP7). Acid depolymerization conditions: see § III-I-2.4. Derivatization conditions: see § III-I-2.6 for depolymerized NC1, and § III-I-2.7 for cellobiose standards. CE conditions: see Figure III-I-1b.

Upon zooming the LIF scale, a more complex fingerprint appears for the first repeating patterns, which should retain valuable information on the starting NC sample and/or on the cellulose used to manufacture this NC. The identification, based on migration times, of the major peaks appearing in the

electropherogram that can be assigned to the NC sample was performed by injecting a mixture of APTS-derivatized cellodextrin standards just after (or before) the partially hydrolyzed NC, and allowing them to migrate inside the capillary in the same run. The main peaks obtained after NC depolymerization migrating in the time frame of ca 7 to 12 min correspond to cellodextrins DP3 to DP7.

In order to gain a deeper insight into the nature of the compounds obtained after partial acid depolymerization of NCs, MALDI-TOF MS analyses of partially hydrolyzed nitrocellulose NC1 were performed in both negative and positive ionization modes. Negative mode was well known to favor the detection of molecules carrying anionic moieties such as nitro groups, and positive one is the most sensitive for neutral or cationic ones. No ions corresponding to cellulose oligomers with or without nitro groups were detected in negative mode (data not shown). On the other hand, spectra obtained in positive mode displayed an ion distribution with a repeated mass difference of 162 between each successive ion peak, corresponding to unmodified hexose-based oligomers (Figure III-I-9). Indeed, mass spectra clearly showed ions from m/z 1013.5 (cellohexaose) to m/z 2148.1 (cellotridecaose) (Figure III-I-9a), and from m/z 851.4 (cellopentaose) to m/z 2634.0 (cellohexadecaose) (Figure III-I-9b) for 20- and 40 min-depolymerization times, respectively, corresponding to the sodiated form of oligosaccharides, as commonly observed in MALDI-TOF MS analysis of carbohydrates. A minor ion series featured by a mass defect of 18 was also observed on the 40 min-depolymerization mass spectrum. These weak-intensity ions probably result from the dehydration of the hexose-based oligomers which should be favored by the long acid treatment. The absence of ions during MS analysis in negative mode and detection of unmodified oligomers in positive mode support the fact that the tested acidic depolymerization conditions of nitrocellulose yield to the complete loss of nitro groups.

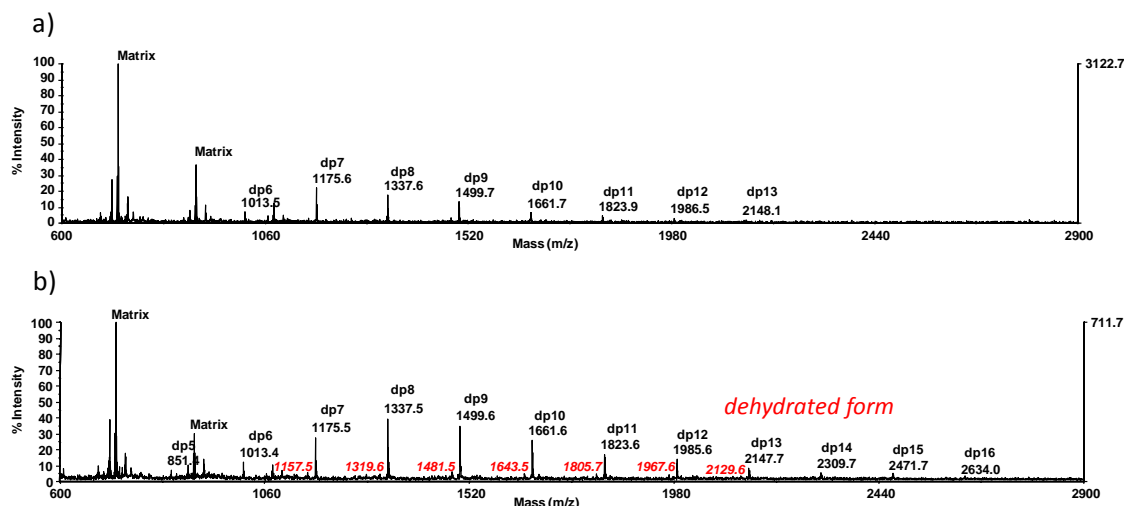


Figure III-I-9. Positive MALDI-TOF mass spectra of nitrocellulose NC1 after acid depolymerization for (a) 20 min and (b) 40 min. Other acid depolymerization conditions: see § III-I-2.4. MS conditions: see § III-I-2.2 and III-I-2.8.

5. Conclusions

This work first establishes that the direct derivatization of a NC sample by APTS fails to produce a representative fingerprint of this sample being amenable to be exploited for reliable analytical characterization purposes, insofar as the shortest polymer chains are preferentially derivatized, while long chains are not labeled at all, because of limited solubility in the derivatization medium. Nevertheless, on analogy with bottom-up strategies followed for protein analysis, a combined approach entailing a partial acid depolymerization step, prior to APTS labeling, to generate oligosaccharidic mixtures that are easier to characterize and provide diagnostic signals relevant to the initial NC sample, might be of actual forensic interest. In this trends, acid depolymerization, and APTS derivatization conditions were optimized. For the first time, oligocellodextrin patterns (composed of $\beta(1-4)$ glucopyranoses units, as celluloses) were identified in the products resulting from acid depolymerization, both directly by MALDI-TOF MS, and after APTS labeling by CE-LIF. Nevertheless, at this time, no trace of nitrated compound has been identified, demonstrating that denitration occurred upon depolymerization. As a prospect of this work, a deeper identification of the minor compounds appearing in the complex pattern of each DP in the electrophoretic fingerprints (see e.g. zoom in Figure III-I-8) by a CE-MS coupling holds great promise to identify either minor residues containing nitro groups or minor structural defaults belonging to the starting cellulose. Another strategy to consider might be to investigate milder ways of depolymerization such as nitrous acid or radical

depolymerization at ambient temperature previously described for the production of oligosaccharides from functional polysaccharides, while preserving their (labile) functional groups.

References

- [1] M.A. Fernández de la Ossa, M. López- López, M. Torre, C. García-Ruiz, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1740-1755.
- [2] C.W. Saunders, L.T. Taylor, *J. Energy. Mater.* 8 (1990) 149-201.
- [3] D.S. Moore, S.D. McGrane, *J. Mol. Struct.* 661 (2003) 561-566.
- [4] D. Dolinak, S.H. Wise, C. Jones, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 29 (2008) 312-319.
- [5] K. Hakansson, R.V. Coorey, R.A. Zubarev, V.L. Talrose, P. Hakansson, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 337-346.
- [6] C.M. Mahoney, G. Gillen, A.J. Fahey, *Forensic Sci. Int.* 158 (2006) 39-51.
- [7] W. Meier-Augenstein, H.F. Kemp, C.M. Lock, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 23 (2009) 2011-2016
- [8] M.T. Combs, United States Patent WO2013006218 A1
- [9] P.V. Rooijen, Characterization of nitrocellulose by 2D-HPLC (2013) Bachelor thesis, University of Amsterdam (downloaded in December 2013 from www.science.uva.nl/onderwijs/.../f1544880797.pdf)
- [10] D. Crokek, B. Dankowski, Sonolysis of nitrocellulose fines, US Army Corps of Engineers, Engineer Research and Development Center, Technical report ERDC/CERL TR-00-14 (May 2000)
- [11] D.K. MacMillan, C.R. Majerus, R.D. Laubscher, J.P. Shannon, *Talanta* 74 (2008) 1026-1031.
- [12] M. López- López, J.M. Ramiro Alegre, C. García-Ruiz, M. Torre, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 196-203.
- [13] D.L. Freedman, J.M. Cashwell, B.J. Kim, *Waste Manage.* 22 (2002) 283-292.
- [14] P. Deacon, A. Macdonald, P. Gill, N. Mai, M.A. Bohr, H. Pontius, M. Hust, W. Klerk, C. Bater, STANAG 4178 (ED2) (2009).
- [15] M. Marx-Figini, O. Soubelet, *Polym. Bull.* 6 (1982) 501-508.
- [16] D.M. Crokek, P.A. Kemme, J.M. Day, National Technical information Service of the US Department of Commerce, technical report ADA 398732 (sept 2001)
- [17] D.M. Crokek, J.M. Day, P.A. Kemme, Incineration by-products of AA2, NC fines and NG slums, National Technical Information Service of the US Department of Commerce, technical report ADA 395160 (2001)
- [18] D.M. Crokek, P.A. Kemme, J.M. Day, J. Cochran, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4346-4351.
- [19] K. Katoh, L. Le, M. Kumasaki, Y. Wada, M. Arai, M. Tamura, *Thermochim. Acta* 431 (2005) 161-167.
- [20] K. Katoh, L. Lu, M. Kumasaki, Y. Wada, M. Arai, *Thermochim. Acta* 431 (2005) 173-176.
- [21] M.A. Fernández de la Ossa, F. Orteja-Ojeda, C. García-Ruiz, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 197-204.
- [22] M.A. Fernández de la Ossa, M. Torre, C. García-Ruiz, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 149-155.
- [23] H. Cottet, C. Simo, W. Vayaboury, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 59-73.
- [24] R.A. Evangelista, A. Guttman, F-T.A. Chen, *Electrophoresis* 17 (1996) 347-351.
- [25] F.T.A. Chen, R.A. Evangelista, *Anal. Biochem.* 230 (1995) 273-280.
- [26] Z. Szabo, A. Guttman, T. Rejtar, B.L. Karger, *Electrophoresis* 31 (2010) 1389-1395.
- [27] F-T.A. Chen, R.A. Evangelista, *Electrophoresis* 19 (1998) 2639-2644.
- [28] S. Yamamoto, C. Shinohara, E. Fukushima, K. Kakehi, T. Hayakawa, S. Suzuki, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4772-4778.
- [29] A. Bui, B. Kocsis, F. Kilár, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 70 (2008) 1313-1316.
- [30] M.A. Kabel, W.H. Heijnis, E.J. Bakx, R. Kuijpers, A.G.J. Voragen, H A. Schols, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 119-126.
- [31] S. Murray, M. McKenzie, R. Butler, S. Baldwin, K. Sutton, I. Batey, G.M. Timmerman-Vaughan, *Anal. Biochem.* 413 (2011) 104-113.
- [32] C-Y. Wang, Y-Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 431-438.
- [33] R.A. Evangelista, F-T. A. Chen, A. Guttman, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 273-280.
- [34] R.A. Evangelista, M-S. Liu, F-T. A. Chen, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2239-2245.
- [35] K. Sei, M. Nakano, M. Kinoshita, T. Masuko, K. Kakehi, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 273-281.

- [36] L. A. Gennaro, O. Salas-Solano, *Anal. Chem.* 2008, 80, 3838–3845.
- [37] C.R. Wilke, P. Chang, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 1 (1955) 264-270.
- [38] P. Thibault, S. Honda, *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates, Methods in Molecular Biology*, Vol. 213, Humana Press, Totowa, 2003, p 115
- [39] M. Olajos, P. Hajós, G.K. Bonn, A. Guttman, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4241-4244.
- [40] A. Guttman, F-T.A. Chen, R. A. Evangelista, N. Cooke, *Anal. Biochem.* 233 (1996) 234-242.
- [41] A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, 763 (1997) 271-277.
- [42] J. Schwarzer, E. Rapp, U. Reichl, *Electrophoresis* 29 (2008) 4203-4214.
- [43] M.G. O'Shea, M.K. Morell, *Electrophoresis* 17 (1996) 681-686.
- [44] A. Guttman, F-T. A. Chen, R. A. Evangelista, *Electrophoresis* 17 (1996) 412-417.
- [45] T.S. Raju, J.B. Briggs, S.M. Borge, A.J. Jones, *Glycobiology* 10 (2000) 477-486.
- [46] M. Stefansson, *Carbohydr. Res.* 312 (1998) 45-52.
- [47] B. Nagels, F. Santens, K. Weterings, E.J.M. Van Damme, N. Callewaert, *Electrophoresis* 32 (2011) 3482-3490.
- [48] S. Ma, W. Nashabeh, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5185-5192.
- [49] N. Fraysse, C. Verollet, F. Couderc, V. Poinot, *Electrophoresis* 24 (2003) 3364-3370.
- [50] B. J. Kim, H-N. Hsieh, F-J.Tai, US Army Corps of Engineers (1999) CERL Technical Report 99/45.

CHAPITRE II : Développement d'une nouvelle méthode d'analyse de cellodextrines non dérivés par électrophorèse capillaire avec détection par absorbance UV directe induite photochimiquement

Analysis of underivatized cellodextrin oligosaccharides by capillary electrophoresis with direct photochemically-induced UV-detection

Elodie Alinat^{1,2,3}, Selma Jemmali^{1,3}, Nathalie Delaunay^{1,3}, Xavier Archer², Pierre Gareil^{1,3,4*}

¹PSL research University, ESPCI ParisTech, Laboratory of Analytical and Bioanalytical Sciences, and Miniaturization, 75005 Paris, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), 75015 Paris, France

³CNRS, CBI, UMR 8231, 75005 Paris, France

⁴PSL research University, Chimie ParisTech, 75005 Paris, France

Key words: *cellodextrins, oligosaccharides, capillary electrophoresis, design of experiments, direct UV detection.*

Abbreviations: analysis of variance (**ANOVA**), background electrolyte (**BGE**), central composite design (**CCD**), capillary electrophoresis (**CE**), degree of polymerization (**DP**), electroosmotic flow (**EOF**), hexadimethrine bromide (**HDMB**), mass spectrometry (**MS**), naphthalene sulfonate (**NS**)

Abstract:

Carbohydrates play an important role in the fields of food and non-food crops, forensics, and in the process of life. Consequently, carbohydrates analysis, not to mention its complexity, is getting more and more important. This work focuses on the development of a new method allowing, for the first time, the simultaneous separation of underivatized glucose and the first six cellodextrin oligomers (cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose), and 8 carbohydrates (ribose, xylose, fructose, mannose, galactose, maltose, lactose, and sucrose) by capillary electrophoresis with direct photochemically-induced UV absorbance detection. Separations were achieved with a highly alkaline background electrolyte (BGE) containing sodium chloride and detection was performed by mid-UV absorbance after photo-oxidation in the detection window. To significantly reduce the analysis time, electroosmotic flow was reversed using a dynamic capillary coating by hexadimethrine bromide. A central composite design was carried out to determine the

effects of BGE conductivity and sodium hydroxide concentration on resolutions between neighboring peaks, and analysis time. A desirability analysis on modeled responses was applied to maximize resolutions and to minimize analysis time. Then, the optimum conditions obtained from the model were experimentally checked. The simultaneous analysis in 20 min total runtime of the 15 carbohydrates plus internal reference (naphthalene sulfonate) was carried out at 25°C with a BGE composed of 77.4 mM NaOH and 183 mM NaCl to adjust the conductivity at the optimum value. Finally, the resolution robustness of the method was checked. This new method will be applied to analyze the hydrolysates obtained after partial acid depolymerization of nitrocellulose in which the 8 carbohydrates might be potential interfering compounds. It should also be of interest to monitor food and non-food crop products.

1. Introduction

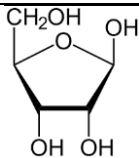
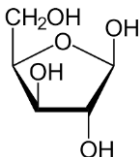
Carbohydrates are ubiquitous compounds in the living world, as natural and degradation products, metabolites or conjugates. They are also widely used as food or beverage additives. This class of compounds of tremendous complexity actually encompasses a variety of molecules which can differ in size (mono-, oligo- and polysaccharides), epimerization or isomerization, glycosidic linkage, branching, and functionality (carboxylation, sulfation, nitration...). An armory of analytical, and especially, separation techniques has been used for identification and quantification of carbohydrates, among which thin-layer chromatography [1], liquid chromatography [2], gas chromatography [2,3], and capillary electrophoresis (CE) [2,4-5]. Among the liquid chromatographic modes, normal phase [6], reversed phase [7,8], and more recently hydrophilic interaction chromatography (HILIC) [9], partition chromatography, cation and anion exchange chromatography [10] and ion exclusion chromatography, and gel filtration chromatography [11] have all been commonly employed. Separations have been based on hydrogen bonding, size, complexing ability, and in some cases charge. As far as detection is concerned, great difficulties are encountered due to the lack of a chromophoric moiety. According to the sensitivity requirements and separation mode, different detection strategies have been implemented, namely, without- or with pre- or post-column derivatization. The most popular direct detection modes are refractive index, evaporative light scattering [12,13], charged aerosol [14], and when high sensitivity is needed, pulse amperometric detection [15,16]. More selective and sensitive detection can also be reached by fluorescence after derivatization with a fluorophore (e.g., 2-aminopyridine, anthranilic acid, para-aminobenzoic acid methyl ether, 2-aminobenzamide, benzamide [17-19]), or a fluorogenic (e.g., arginine, 2-cyanoacetamide [20,21]) group. Mass spectrometry (MS) detection has also been reported in positive [22] and negative [23] ionization modes. In addition to all these techniques, CE, with its ability to be implemented in a wide range of background electrolyte

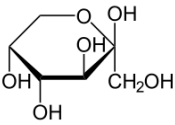
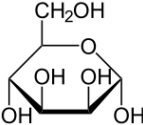
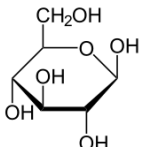
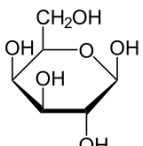
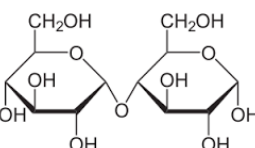
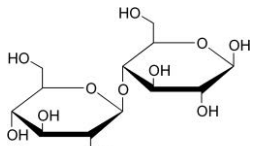
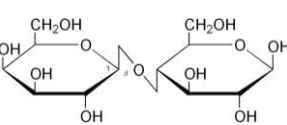
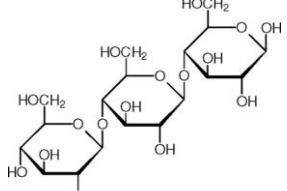
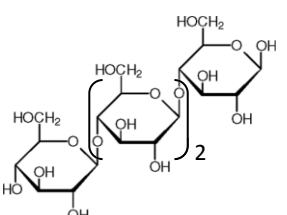
(BGE) conditions, along with its high separation efficiency, low reagent consumption, and speed, is becoming an effective alternative to chromatographic techniques for the analysis of all types of carbohydrates [4,5,24,25].

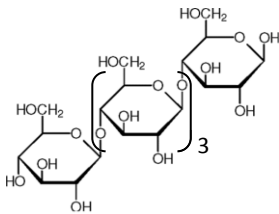
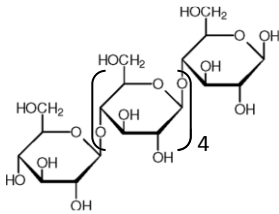
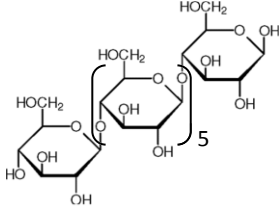
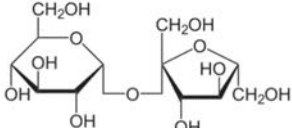
Various approaches have been developed to separate and detect carbohydrates using CE. These approaches have used the inherent properties of carbohydrates such as (i) their capacity to complex ions such as borate and metal cations to directly form charged species in the capillary, which can be separated in an electric field and detected by absorbance in the low-UV range, (ii) the reactivity of their reducing end, which can be used to label carbohydrates with charged UV-absorbing or fluorescent tags, allowing both their separation and sensitive detection [24-26]. Carbohydrates analysis by CE without any derivatization step is particularly challenging due to the lack of a chromophore enabling easy UV detection, and of readily ionizable functions. To be mentioned in this trends is their electrochemical oxidation at the surface of metallic electrodes, allowing their sensitive detection [24], and coupling to MS [27,28]. Recently, the CE separation along with direct UV detection of underivatized mono- and disaccharides has also been demonstrated under highly alkaline BGE conditions ($\text{pH} > 12$) [29,30], providing both carbohydrate ionization (pK_a 12-13), and photo-oxidation of the analytes into UV-absorbing derivatives in the detection window [31-33].

This paper focuses on the development of a CE method for the simultaneous analysis of underivatized glucose and 6 cellodextrins (β -1,4-anhydroglucopyranoses having degrees of polymerization of 2 to 7), and 8 other carbohydrates (ribose, xylose, fructose, mannose, galactose, maltose, lactose, and sucrose) (Table III-II-1), which are of interest in both forensic and food and non-food crop analysis.

Table III-II-1: Names, structures, molecular weights, and pKa values (25 °C [34]) of studied carbohydrates.

Compound	Structure	M (g mol^{-1})	pKa
Ribose		150.1	12.22
Xylose		150.1	12.15

Fructose		180.2	12.23
Mannose		180.2	12.08
Glucose		180.2	12.35
Galactose		180.2	12.35
Maltose		342.3	11.94
Cellobiose		342.3	Not available
Lactose		342.3	11.98
Cellotriose		504.4	Not available
Cellotetraose		666.6	Not available

Cellopentaose		828.7	Not available
Cellohexaose		990.9	Not available
Celloheptaose		1153.0	Not available
Sucrose		342.3	12.51

Indeed, cellodextrins can be produced as intermediate products after partial acidic depolymerization of nitrocellulose which can be used as explosive. To the best of our knowledge, the direct separation of cellodextrin oligomers by liquid chromatography and CE, unlike malto-oligosaccharides, has never been reported with baseline resolution. Electrolyte conditions (sodium hydroxide and sodium chloride concentrations) were optimized using a multivariate approach. Detection was achieved by direct UV absorbance induced photo-chemically.

2. Materials and methods

2.1. Standards and electrolyte

D-(+) maltose monohydrate ($\geq 99\%$), D-(-) ribose ($\geq 99\%$), D-(+) mannose ($\geq 99\%$), D-(+) xylose ($\geq 99\%$), D-(+) galactose ($\geq 99\%$), D-(-) fructose ($\geq 99\%$), sucrose ($\geq 99.5\%$), β -lactose ($\geq 99\%$), D-(-) glucose ($\geq 99.5\%$), used as standard analytes, sodium chloride ($\geq 99.5\%$), hexadimethrine bromide (HDMB) used as electro-osmotic flow (EOF) reversing agent, and sodium 2-naphthalene sulfonate (NS, 98%) used as internal reference were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Cellobiose (DP2, 99.2%), cellotriose (DP3, 97.3%), cellotetraose (DP4, 97.3%), cellopentaose (DP5,

97.5%), cellohexaose (DP6, 89%), and celloheptaose (DP7, 80%) used as standard analytes were supplied by Elicityl (Crolles, France).

Concentrated volumetric solutions (ConvoL Normadose®) of 1 M sodium hydroxide obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) were employed for electrolyte preparations. All standard analyte solutions and background electrolytes (BGE) were prepared in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3-UV system (Millipore, Molsheim, France). Stock solution at 1 M sodium chloride was prepared weekly by dissolving the appropriate amount in ultra-pure water and stored at 4°C. The final BGEs were obtained by mixing adequately-diluted 1 M NaOH solution, 1 M NaCl solution, and 10 g L⁻¹ HDMB solution. All BGEs were prepared daily and filtered through a 0.20 µm cellulose acetate membrane (VWR). The maltose, ribose, mannose, xylose, galactose, fructose, sucrose, lactose, and glucose stock solutions at 10 g L⁻¹ were prepared weekly by dissolving the appropriate amounts in ultra-pure water and stored at 4°C. Six stock solutions of 2 g L⁻¹ cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose, and celloheptaose were prepared every week by dissolution in ultra-pure water. Standard mixtures of all 15 carbohydrates were prepared daily by pipetting 7.15 µL of each carbohydrate (ribose, xylose, glucose, fructose, mannose, galactose, maltose, lactose, and sucrose) solution, 71.5 µL of each cellodextrin solution and 1.75 µL of 10 mM NS stock solution.

2.2. Instrumentation

All CE separations were carried out with an Agilent Technologies 7100 capillary electrophoresis system (Massy, France) equipped with a photodiode array absorbance detector. Data acquisition and instrument control were carried out with HP 3D Chemstation software (Agilent Technologies). Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with dimensions of 60 cm (51.5 cm to the detector) × 50 µm i.d × 365 µm o.d were used for all CE analyses.

2.3. Statistical analysis softwares

Experimental results were analyzed using Excel 2010 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France) and JMP 11.0 (S.A.S Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.4. Electrophoretic conditions

New capillaries were activated by successive flushes with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, and finally BGE, each under 935 mbar for 10 min (15 capillary volumes for a 60 cm long capillary). Between each run, the capillary was flushed with BGE under 935 mbar for 3 min (ca 4.5 capillary volumes). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 5 s (0.6% of capillary volume). Separations were performed at 25°C under a voltage of -13 kV. This voltage was

selected after checking that whatever the BGE, the linearity of Ohm's law was verified. The detection wavelength was 270 nm with the reference set at 350 nm and bandwidths set at ± 6 nm and ± 40 nm, respectively. At the end of the day, capillary was rinsed with water under 935 bar for 20 min (30 capillary volumes) and stored in the apparatus with both ends dipped in water.

2.5. Calculation of the conductivity values

CE instrument was used to determine the conductivity values of the used BGEs. Before each measurement, capillary was filled with the BGE under a pressure of 935 mbar for 10 min (ca 15 capillary volumes). The conductivity values of the BGEs were obtained from the measured current intensity by applying a voltage. Conductivity was calculated according to equation (1) derived from Ohm's law:

$$\kappa = \frac{4LI}{\pi d_c^2 V} \quad (1)$$

where L is the capillary length, I the measured current intensity, d_c the inner diameter, and V the applied voltage [35].

Calibration was performed with 0.1 and 0.01 M KCl solutions ($\kappa = 1.2073$ and 0.1295 S m^{-1} at 25°C , respectively). BGE conductivity was adjusted at the targeted value with 1 M NaCl.

3. Experimental design

3.1. Selection of the factors and response

According to the data obtained in literature [34] and preliminary studies, the factors most affecting the carbohydrate migration were sodium hydroxide concentration in the BGE and the BGE conductivity (κ). These 2 factors were selected to optimize the separation of the 15 carbohydrates of interest in a minimum analysis time. BGE conductivity was preferred over ionic strength or sodium chloride concentration as a factor, because it was deemed more relevant with respect to Joule heating, and it can be easily measured experimentally, whereas in such highly concentrated electrolytes, the significance of calculated ionic strength from analytical concentrations can be controversial. The selected responses for the optimization of the separation were resolutions between adjacent peaks and analysis time corresponding to the migration time of the last peak.

3.2. Choice of the experimental design

To study the effects of sodium hydroxide concentration in the BGE and the BGE conductivity on the carbohydrate migration, a central composite design (CCD) was used. The CCD was obtained by combining a two-level factorial design (2^2 experiments), a star design (2×2 experiments), and 6 central

points (coded 0). The central point was repeated 6 times to estimate the experimental error. Consequently, the matrix of experiments consisted of 14 experiments. The CCD was divided into two orthogonal blocks. The mathematical relationship between responses (resolutions and analysis time) and factors was expressed by equation (2):

$$y(X_{1 \leq i \leq 2}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad (2)$$

where $y(X_{1 \leq i \leq 2})$ was the predicted response, X_i the coded values of the factors, β_0 was a constant, β_i the linear coefficients, β_{ii} the quadratic coefficients, β_{12} the interaction coefficient and ε the random error. An analysis of variance (ANOVA) was carried out to evaluate the significance of each term in the equation and to estimate the goodness of the fit. The matrix of experiments (Table III-II-2) was generated by JMP 11 software.

Table III-II-2: Matrix of Central Composite Design used in this work.

Experimental order	Block	Factor 1 : [NaOH]	Factor 2 : BGE conductivity
1	1	0	0
2	1	1	-1
3	1	-1	-1
4	1	0	0
5	1	1	1
6	1	-1	1
7	1	0	0
8	2	0	0
9	2	-1.4	0
10	2	0	1.4
11	2	0	0
12	2	0	-1.4
13	2	1.4	0
14	2	0	0

3.3. Factor ranges and levels

Factor ranges were chosen by considering experimental constraints and preliminary experimental investigations. Considering sodium hydroxide concentration in the BGE, the maximum value was set at 160 mM (pH = 13.20) and the lower value was 30 mM (pH = 12.48). In fact, all the studied carbohydrates should have a pKa value ranging from 12 to 13 (Table III-II-1). To ionize carbohydrates, a minimum pH of about 12.5 is thus recommended. To limit Joule effect, It was decided not to outpass a current intensity of ca 200 μ A for the used capillary under 13 kV, which fixed the maximum sodium hydroxide concentration to 160 mM, and the highest boundary for conductivity (κ) to 4.58 S/m. The lowest value for BGE conductivity was set at 3.27 S/m. In the experiments coded (1, -1) and (1.4, 0) the

BGE conductivities were imposed by the conductivity of sodium hydroxide at 141.4 mM and 160 mM, respectively. Finally, the coded and real levels of the factors are given in Table III-II-3.

Table III-II-3: Factors and level values used in the experimental design

Coded levels	[NaOH] (mM)	Conductivity, κ , measured at 25°C (S/m)
-1.4	30	3.27
-1	48.6	3.46
0	95	3.92
1	141.4	4.39
1.4	160	4.58

4. Results and discussion

The starting conditions for this study on the separation of cellodextrin oligomers were those that were optimized in our group for the separation of a mixture of mono- and disaccharides, composed of fructose, glucose, lactose, and sucrose, of forensic interest, and of ribose, xylose, mannose, maltose, and galactose, which represent potentially interfering compounds [34]. To this mixture were added the first six cellodextrin oligomers, which can be produced as intermediate residues, during the partial acidic depolymerization (and denitration) of nitrocellulose, according to the conditions followed, and prior to its completeness, leading to glucose. Analysis of cellodextrins should also be of interest in the cellulose industry, and for the characterization of food and non-food crops. Preliminary monovariate experiments were conducted in order to check the influence of sodium hydroxide and sodium chloride concentrations, temperature, and assess the most favorable conditions for electro-osmotic flow. Temperature was not included as a factor in the experimental design, because preliminary experiments performed at 26.5 °C (which was found optimum in our previous work [34]) and 20 °C showed slight, if any, influence on resolutions. It was set in this work at 25 °C. Finally, separations were performed under co-EOF conditions, using HDMB as EOF reversing agent, which allows to reduce the analysis time without impairing resolutions. Contrary to previous work, however, use of HDMB as a semi-permanent coating, as classically, failed to generate a stable reversed EOF, likely because of competing lixiviation of the capillary surface by the high concentration of hydroxide ions. As described in §2.1, HDMB was rather always present in the used BGEs as a dynamic coating at a final concentration of 0.1 g L⁻¹. Throughout the realized experiments, peak assignment was checked by spiking the working standard mixture with individual carbohydrate standards. A thorough examination of all the electropherograms showed us that in all the BGE compositions tested, no change in carbohydrate migration order occurs. Likewise, sucrose was always the late migrating analyte. Therefore, its

migration time was retained as an appraisal of the analysis time.

4.1. ANOVA and fitting of quadratic model

The results of ANOVA of regression are presented in Table III-II-4. These results indicate that the model was significant (using 5% significance level) for all studied resolutions with p-values lower than 0.05. The obtained determination coefficients (R^2) also show a good fit of the model.

Table III-II-4: ANOVA results for the resolution and analysis time.

	F-value	P-value	R^2
Resolution			
Ribose/Xylose	175.73	< 0.0001	0.99
Xylose/Fructose	45.46	< 0.0001	0.98
Fructose/Mannose	33.99	< 0.0001	0.97
Mannose/Glucose	211.07	< 0.0001	0.99
Glucose/Galactose	446.60	< 0.0001	0.99
Galactose/Maltose	6.14	0.0155	0.84
Maltose/Cellobiose	5.57	0.0201	0.83
Cellobiose/Lactose	12.21	0.0021	0.91
Lactose/Cellotriose	135.35	< 0.0001	0.99
Cellotriose/Cellotetraose	5.51	0.0206	0.83
Cellotetraose/Cellopentaose	22.01	0.0003	0.95
Cellopentaose/Cellohexaose	4.01	0.0460	0.77
Cellohexaose/Celloheptaose	48.85	< 0.0001	0.98
Celloheptaose/Sucrose	53.76	< 0.0001	0.98
Analysis time	11.06	0.0029	0.90

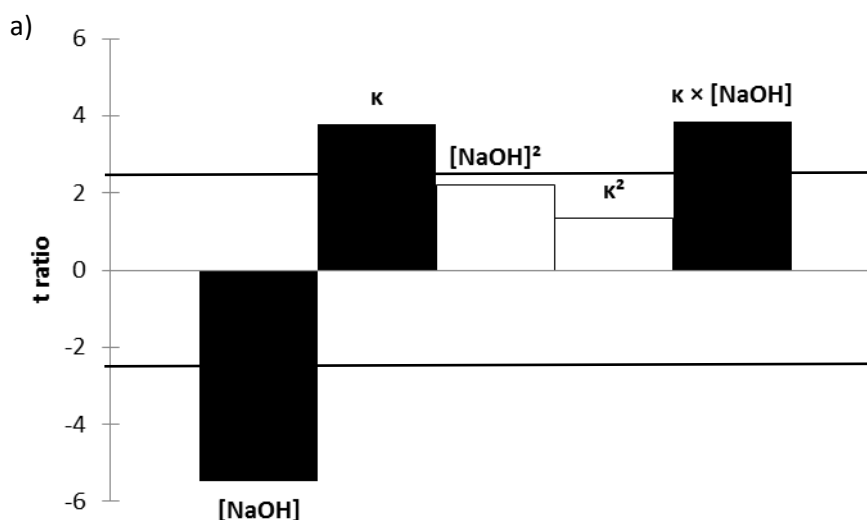
4.2. Effects of factors on carbohydrate migration and detection

Second order polynomial equation (2) was used to identify the influential factors for each response (resolutions, and sucrose migration time). The values of the model coefficients (linear β_i , quadratic β_{ii} , and first-order interaction β_{12}) were calculated by multiple regression analysis of the experimental data using regression coefficients. The coefficient significance was evaluated by comparing the coefficient estimate with its standard-deviation (calculated from the regression residuals) using Student's t-test.

A factor or an interaction was considered as statistically significant with a first kind risk set at 5% if the value of the t-ratio (coefficient normalized by its standard deviation) was out of the 2.4 range. The histograms shown in Figure III-II-1 graphically illustrate the influence of the factors and their interactions on sucrose normalized migration time (Figure III-II-1a) and resolution between cellohexaose and celloheptaose (Figure III-II-1b). In Figure III-II-1, the amplitude of each effect is indicated by the horizontal bars and the horizontal line corresponds to the 2.4 level. The significant factors on the responses appear in black.

The sodium hydroxide concentration in the BGE was the parameter that most influenced, in a negative manner the sucrose normalized migration time. The higher the sodium hydroxide concentration is, the lower the sucrose normalized migration time is. As expected, an increase in NaOH concentration in the BGE involved an increase in negative charge of the carbohydrates, resulting in decreased migration time. BGE conductivity had a significant positive effect on sucrose normalized migration times. Indeed, an increase in BGE conductivity induced a decreased in the EOF and hence an increase in migration time. For sucrose normalized migration times, quadratic terms were not significant. As expected, the first-order interaction between the two parameters also had a significant positive effect on sucrose normalized migration times.

Both linear terms and the first-order interaction were significant for resolution between cellohexaose and celloheptaose responses (Figure III-II-1b). NaOH concentration in the BGE had a significant negative effect on resolutions between cellohexaose and celloheptaose. In fact, as described earlier, an increase in NaOH concentration in the BGE led to a decrease in migration times (due to an increase in the carbohydrate charge) and then a decrease in resolutions. On the other hand, BGE conductivity appeared to have a positive effect on resolutions between cellohexaose and celloheptaose. As expected, an increase in BGE conductivity led to an increase in migration times (due to the decrease in EOF) and consequently an increase in resolutions.



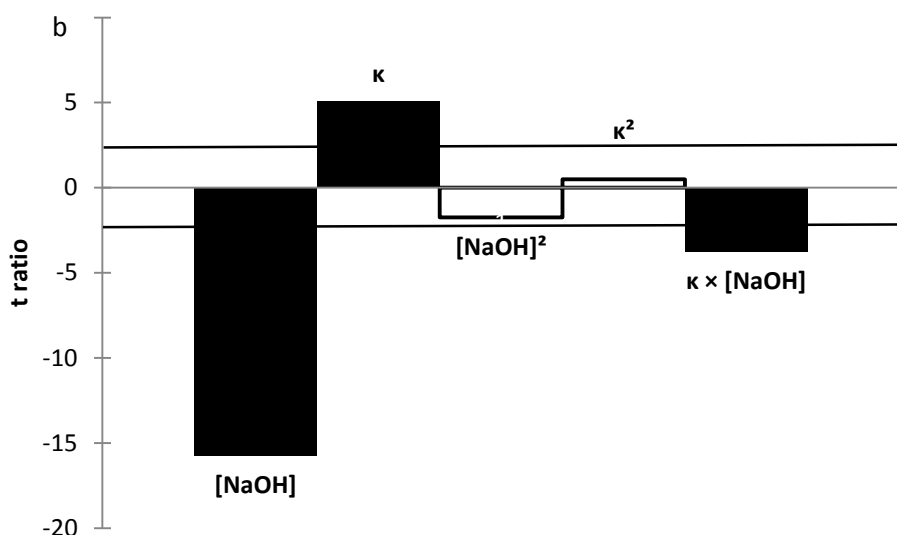


Figure III-II-1. Representation of the effects of sodium hydroxide concentration in the BGE and BGE conductivity on sucrose normalized migration time (sucrose to naphthalene sulfonate migration time ratio) (a) and resolution between cellohexaose and celloheptaose (b). With a first kind risk set at 5%, influent factors appear in black. t-ratio is the coefficient normalized by its standard-deviation. Horizontal bold lines correspond to the 2.4 level.

For the sake of example, Figure III-II-2 shows the electropherograms corresponding to two particular experimental points of the design (central point and point 9). This figure clearly illustrates the influence of the factors on resolution and migration speed. They also significantly impact the detection sensitivity. According to the mechanism of photo-oxidation undergone by the carbohydrates in the detection window, carbohydrate peak heights are reduced upon both (i) decreasing BGE sodium hydroxide concentration, which impacts the concentration of free hydroxide radicals, and (ii) increasing migration speed, which determines the carbohydrate residence time in the detection window. It is worth noting, this decrease in peak height is not observed for NS, which exhibits classical direct UV absorbance. Table III-II-5 shows the values obtained for the normalized corrected areas of each carbohydrate (carbohydrate corrected area divided by NS corrected area) from both of the electropherograms represented in Figure III-II-2. As anticipated, higher sensitivities were obtained under conditions corresponding to Figure III-II-2b where the carbohydrate residence time in the detection window is higher, with a gain in sensitivity varying according to the carbohydrate between 1.03-1.04 (DP2, DP7) to 3.03 (xylose). By multiplying the values for the normalized corrected areas of each carbohydrate by the carbohydrate-to-NS molar mass ratio, the relative molar response factor can be obtained, as given in the last column of Table III-II-5. It appears that under these conditions, the sensitivity of the photochemically induced UV absorbance detection is of the same order of magnitude as the direct UV absorbance of NS, with variations by about a factor of 2, according to carbohydrates. These new data emphasize the complexity of the photo-oxidation process occurring for each carbohydrate in the detection window.

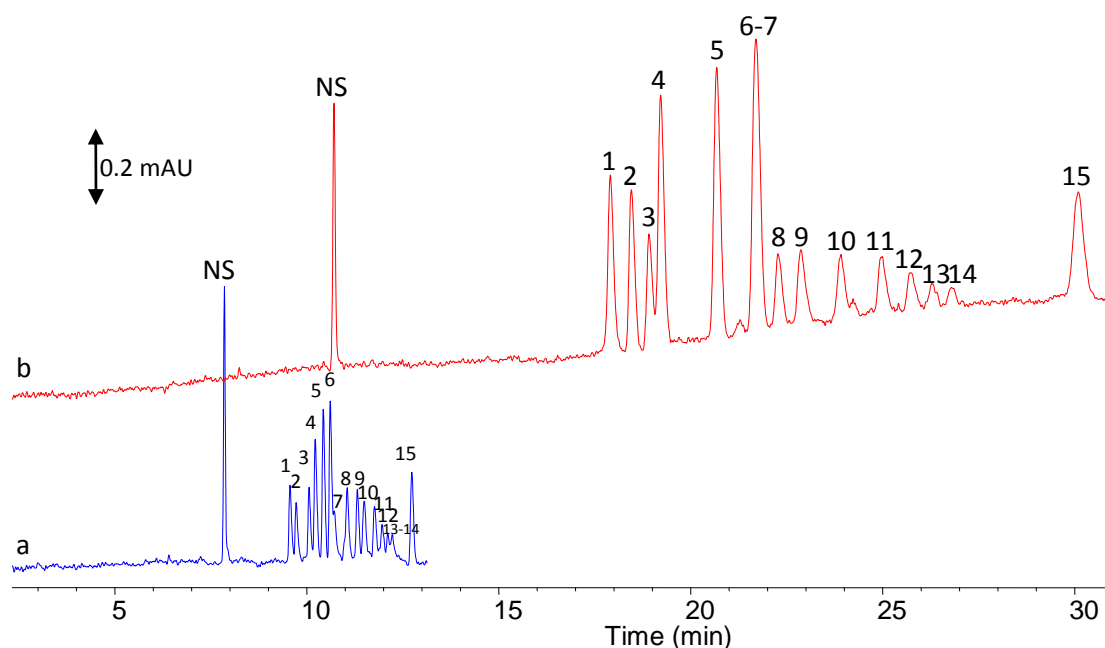


Figure III-II-2. Electropherograms of a standard mixture of the 15 carbohydrates of interest. CE conditions: bare-fused silica capillary, 50 μm (ID) \times 60 cm (detection at 51.5 cm); BGE: (a) 95 mM NaOH (calculated pH, 12.98), 123 mM NaCl ($\kappa = 3.925$) containing 0.1 g L⁻¹ HDMB (central point of the CCD) and (b) 30 mM NaOH (calculated pH 12.48), 260 mM NaCl ($\kappa = 3.925$) containing 0.1 g L⁻¹ HDMB (point 9 of the CCD); temperature: 25°C; applied voltage: -13 kV; hydrodynamic injection: 50 mbars, 5 s; detection: UV at 270 nm. Identification: naphthalene sulfonate (NS), ribose (1), xylose (2), fructose (3), mannose (4), glucose (5), galactose (6), maltose (7), cellobiose (8), lactose (9), cellotriose (10), cellotetraose (11), cellopentaose (12), cellohexaose (13), celloheptaose (14), sucrose (15). Analyte concentration : 0.1 g L⁻¹ each in ultra-pure water.

Table III-II-5: Normalized corrected areas and relative response factors for 13 carbohydrates of interest. Naphthalene sulfonic acid (NS) was used as internal standard to normalize peak areas and response factors. Analyte concentrations and experimental conditions: see Figure III-II-2. Note that data for galactose and maltose, which are not resolved under these conditions, are omitted.

Carbohydrates	Normalized corrected areas. CE conditions: Figure III-II-2a	Normalized corrected areas. CE conditions: Figure III-II-2b	Relative molar response factors (with respect to NS) CE conditions: Figure III-II-2b
Ribose	0.325	0.926	0.67
Xylose	0.259	0.786	0.57
Fructose	0.273	0.530	0.46
Mannose	0.480	1.258	1.09
Glucose	0.565	1.370	1.18
Cellobiose	0.326	0.341	0.56
Lactose	0.228	0.393	0.65
Cellotriose	0.199	0.347	0.84
Cellotetraose	0.167	0.263	0.84
Cellopentaose	0.090	0.188	0.75
Cellohexaose	0.057	0.112	0.53
Celloheptaose	0.075	0.077	0.43
Sucrose	0.334	0.585	0.96

4.3. Optimization of the separation

The optimization of carbohydrate separation was performed using desirability functions and was based on the study of the resolutions and the migration time of the last eluting carbohydrate (sucrose) to evaluate the analysis time. For all resolutions, desirability values were set at 1.0, 0.5 and 0 for resolutions of 1.5, 0.75, and 0, respectively (graphical representation of desirability in the last column of Figure III-II-3). For analysis times of 20, 32.5, and 45 min desirability values of 1, 0.5, and 0 were attributed, respectively. The conditions for optimum carbohydrate separation predicted by the model were in coded values: -0.38 for NaOH concentration, and 0.81 for BGE conductivity, corresponding to a BGE of 4.30 S/m conductivity composed of 77.4 mM NaOH and 183 mM NaCl to adjust the BGE conductivity at the targeted value.

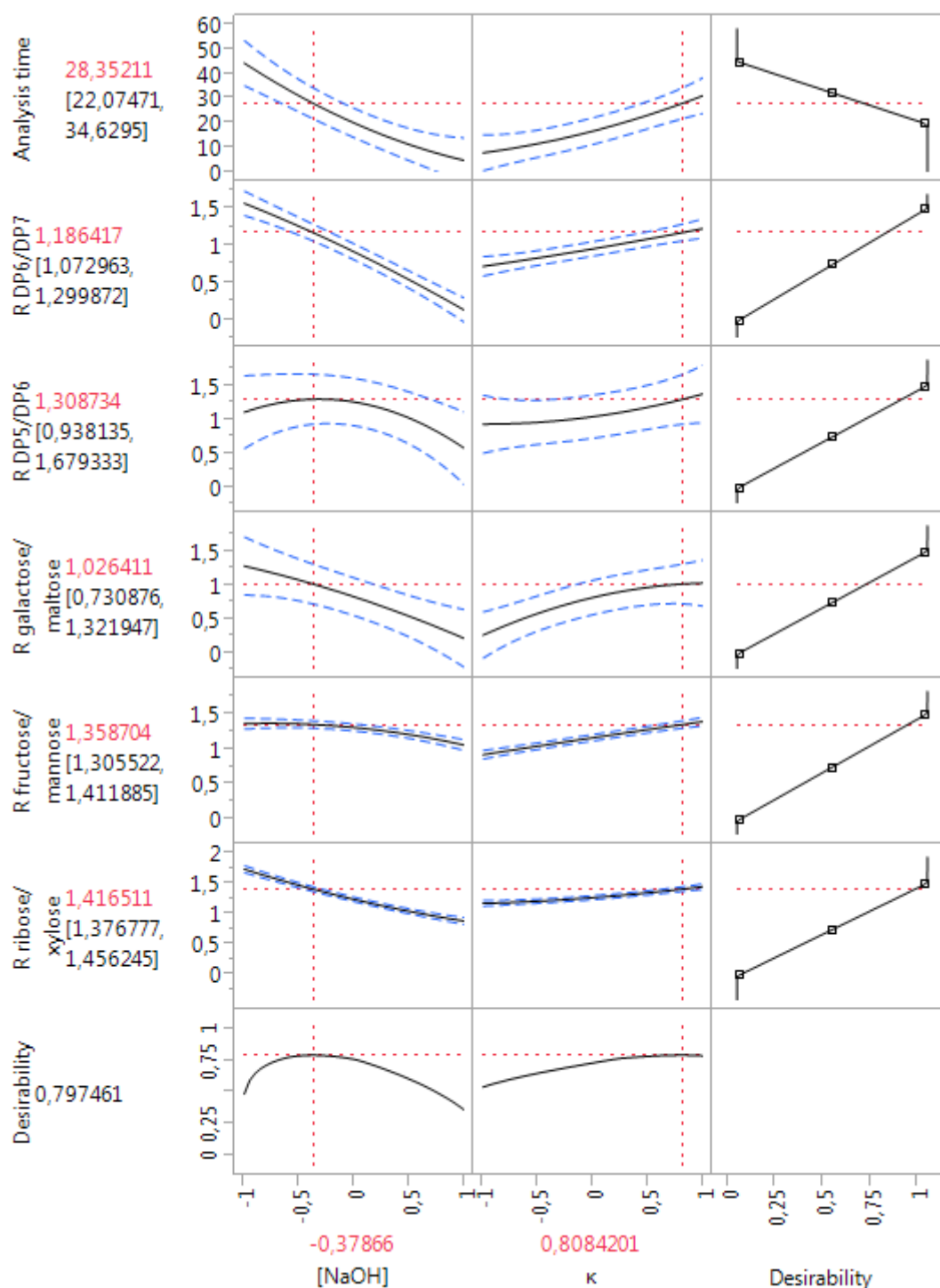


Figure III-II-3. Variations of the predicted modeled responses as a function of sodium hydroxide concentration in BGE and BGE conductivity using prediction profiler of JMP software. The six responses of interest (analysis time and resolutions of the most critical pairs) correspond to the first six rows. The last row indicates the global desirability as a function of the two studied factors represented at optimum coded values in the first two columns. The last column represents the individual desirability values for each response. Values appearing under the name of the responses and under the global desirability are the ones predicted by the model at optimum conditions \pm the corresponding 95% confidence interval.

Figure III-II-4 (a-c) shows the 3D response surface plots and their corresponding contour plots representing the relationship between the two studied factors and resolutions or analysis time. In

Figure III-II-4a and III-II-4b, the domain located below the grid corresponds to the domain for which resolutions between cellopentaose/cellohexaose and maltose/cellobiose were lower than 1.5. In Figure III-II-4c, the domain below the grid corresponds to the one where analysis time was lower than 20 min. As expected, the lower the sodium hydroxide concentration is, the higher the analysis time is, due to a decrease in the carbohydrate charge. Furthermore, an increase in BGE conductivity induced a decreased in the EOF and hence an increase in analysis time.

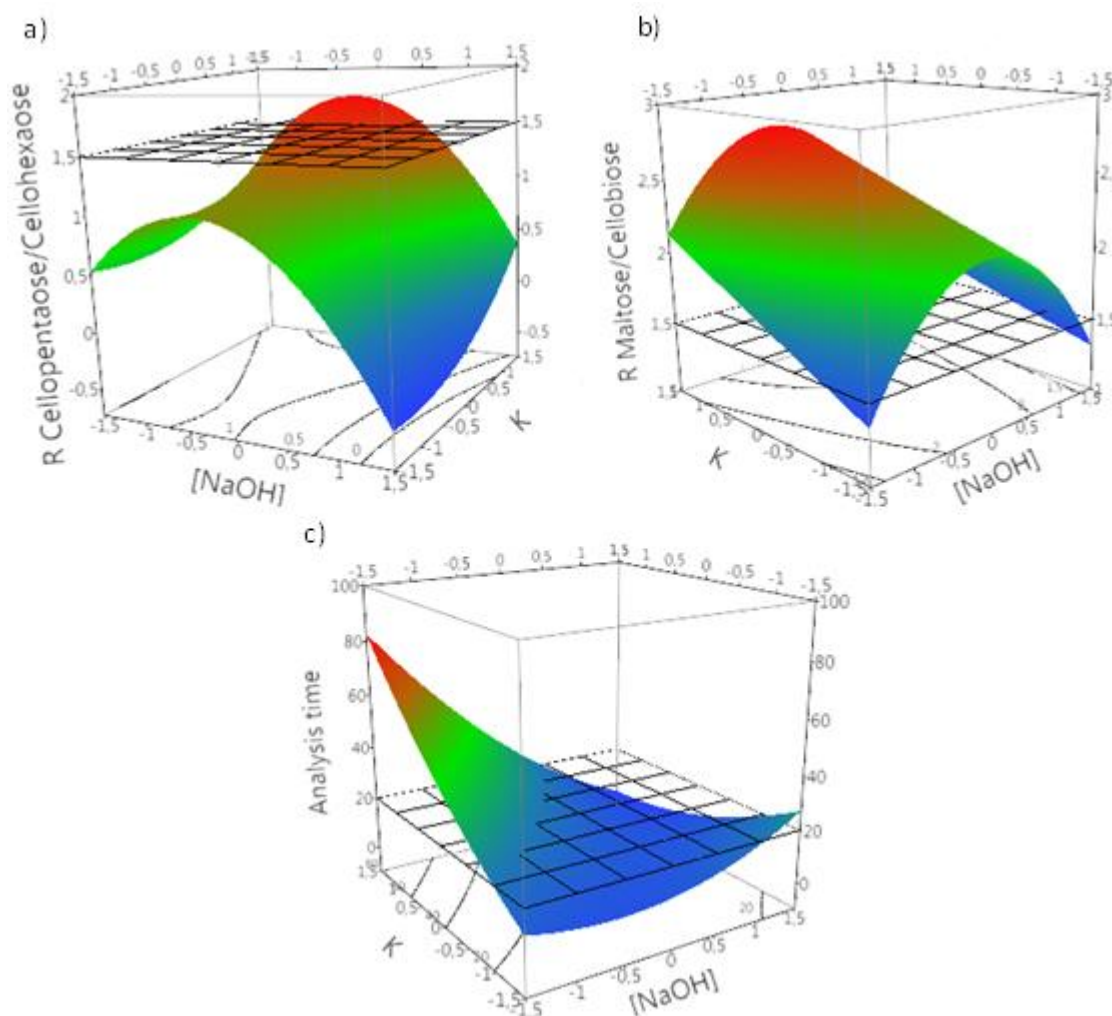


Figure III-II-4. Response surface plots of (a) resolution between cellopentaose/cellohexaose, (b) resolution between maltose/cellobiose, and (c) analysis time as a function of sodium hydroxide concentration in the BGE and BGE conductivity. The grid values at 1.5 for resolution (a, b) and 20 min for analysis time (c) correspond to the values selected for a desirability value of 1. Contour plots below responses surface plots represent isoresponse lines.

4.4. Experimental validation and robustness study

To validate the model, an electrophoretic separation of the 15 carbohydrates of interest was carried out at 25°C using predicted optimal conditions: a BGE composed of 77.4 mM NaOH (calculated

pH = 12.89), 183 mM NaCl and 0.1 g L⁻¹ HDMB. A typical resulting electropherogram obtained under these conditions is presented in Figure III-II-5.

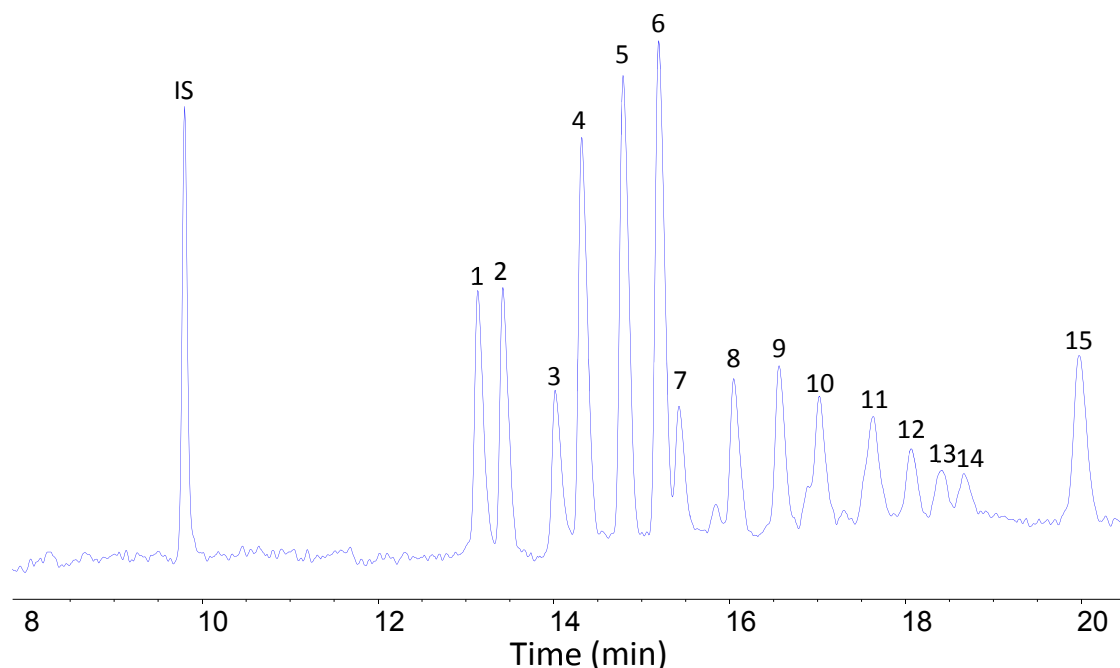


Figure III-II-5. Electropherogram of a standard mixture of the 15 carbohydrates of interest obtained under the predicted optimized conditions. Bare-fused silica capillary, 50 μ m (ID) \times 60 cm (detection at 51.5 cm); BGE: 77.4 mM NaOH (calculated pH, 12.89), 183 mM NaCl containing 0.1 g L⁻¹ HDMB; temperature: 25°C; applied voltage: -13 kV (current: 180 μ A); hydrodynamic injection: 50 mbar, 5 s; detection: UV at 270 nm. Identification: ribose (1), xylose (2), fructose (3), mannose (4), glucose (5), galactose (6), maltose (7), cellobiose (8), lactose (9), cellotriose (10), cellotetraose (11), cellopentaose (12), cellohexaose (13), celloheptaose (14), sucrose (15). Analyte concentration: 0.1 g L⁻¹ each in ultra-pure water.

The electropherogram shows that ribose, xylose, fructose, mannose, glucose, galactose, maltose, lactose, and sucrose are detected in the order of increasing molecular weight and on the whole, increasing pKa orders. Cellodextrins, the pKa of which are unknown, are detected in the order of increasing molecular weight and likely as well, increasing pKa orders. Under the optimum conditions, all peaks are separated in 20 min with resolutions greater than 1 (Table III-II-6). Obviously, resolution between neighboring cellodextrins is decreasing upon increasing DP.

Table III-II-6: Resolutions, migration times, and repeatabilities on normalized migration times and normalized corrected areas under optimized conditions for a standard mixture of the 15 carbohydrates in ultra-pure water. Naphthalene sulfonic acid was used as internal standard to normalize peak areas and migration times. Analyte concentrations and experimental conditions: see Figure III-II-5.

Carbohydrates	t_M (min)	R_s	Repeatability (RSD) for normalized migration times (n = 6) %	Repeatability (RSD) for normalized corrected areas (n = 6) %
Ribose	12.9		0.4	4.7
Xylose	13.2	1.5	0.4	7.3
Fructose	13.7	3.0	0.4	1.7
Mannose	14.0	1.5	0.5	5.8
Glucose	14.4	2.4	0.5	4.4
Galactose	14.8	2.0	0.5	4.3
Maltose	15.1	1.1	0.6	7.0
Cellobiose	15.6	2.8	0.6	2.5
Lactose	16.1	2.3	0.7	2.8
Cellotriose	16.6	1.9	0.7	6.4
Cellotetraose	17.1	2.0	0.8	3.0
Cellopentaose	17.6	1.6	0.8	6.7
Cellohexaose	17.9	1.3	0.8	4.9
Celloheptaose	18.1	1.0	0.9	2.6
Sucrose	19.4	5.0	0.9	3.6

The resolutions between the most critical pairs obtained experimentally were 1.5 (ribose/xylose), 1.5 (fructose/mannose), 1.1 (galactose/maltose), 1.3 (cellopentaose/cellohexaose), and 1.0 (cellohexaose/celloheptaose), which were closed to the predicted values: 1.4, 1.4, 1.0, 1.3, and 1.2, respectively (with root-mean-square errors for predicted values of 0.04, 0.05, 0.27, 0.33, and 0.10, respectively).

Repeatabilities on normalized migration times and corrected peak areas are given in Table III-II-6 for a standard mixture of the 15 carbohydrates of interest in ultra-pure water. Typical RSDs calculated from 6 repetitions were between 0.4 and 0.9% for normalized migration times and between 1.7 and 7.0% for normalized corrected peak areas. It is important to note that RSDs on normalized corrected areas higher than 15% were obtained when BGE was not changed between each run.

The robustness of the separation was evaluated by studying the effect of small controlled changes in factors on the resolutions and on the analysis time. These changes should simulate the maximum experimental error carried out for electrolyte preparation. This error was evaluated at about 5%. To this end, BGE conductivity and sodium hydroxide concentration in the BGE were simultaneously varied within a range of 5% around their optimized levels. In this case, the domain representing $\pm 5\%$ of the optimized conditions was calculated in real values between 73.5 and 81.3 mM for sodium hydroxide

concentration (between -0.46 and -0.29 in coded values) and 4.09 and 4.52 S/m for BGE conductivity (between 0.35 and 1.27 in coded values). The NaCl concentrations used to adjust conductivity to the calculated values, along with the resolutions experimentally obtained from this robustness study are given in Table III-II-7.

Table III-II-7: Resolutions between carbohydrates for robustness evaluation.

[NaOH] in the BGE (mM)	BGE conductivity (S/m)	[NaCl (mM)	Rs Ribose / xylose	Rs Fructose/ Mannose	Rs Galactose/ Maltose	Rs DP5/ DP6	Rs DP6/ DP7	Analysis time (min)
73.5	4.09	169	1.4	1.3	0.9	1.1	0.9	19.7
81.3	4.09	155	1.3	1.3	0.9	1.2	0.8	19.4
73.5	4.52	198	1.3	1.3	1.0	1.5	1.1	20.2
81.3	4.52	181	1.5	1.6	1.2	1.3	1.1	20.4

The resolutions obtained from this robustness study for all carbohydrates indicate that the separation was robust since the variations of the factors around their optimized levels do not produce any significant effect on resolutions between neighboring peaks and on analysis time. Indeed, the obtained resolutions varied within a range of ± 0.2 around the obtained resolutions under the optimized conditions.

5. Conclusions

For the first time, a complete separation ($R_s \geq 1$) of underivatized cellodextrin oligomers up to DP7 along with 8 other carbohydrates was set up. This was achieved by CE under highly alkaline conditions, which also enabled to monitor the cellodextrins by photochemically-induced absorbance detection. The central composite design used in this work allowed us to optimize the major parameters of the BGE influencing the resolutions and analysis time of the 15 carbohydrates of interest. BGE conductivity and BGE sodium hydroxide concentration appeared as influent factors on resolutions between neighboring peaks and on analysis time. The determination of optimal BGE conditions was achieved from a desirability analysis on modeled responses. Finally, this method exhibits good robustness for the resolution of the most critical pairs. It should be of interest for many applications related to cellulose and cellulose derivative processing. Especially, this new method will be applied in our group for forensic purposes to monitor the hydrolysates obtained after partial acid depolymerization of

nitrocellulose and nitrocellulose-containing samples, in which the 8 additional carbohydrates considered in this work might be potential interfering compounds.

References

- [1] Thin Layer Chromatography, fourth edition, B. Fried, J. Sherma, Chromatographic Science Series, vol. 8, Marcel Dekker, NY, 1999.
- [2] Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol 66, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [3] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M. L. Sanz, I. Martinez-Castro, J. Chromatogr. B 879 (2011) 1226-1240.
- [4] Capillary Electrophoresis of Carbohydrates, P. Thibault, S. Honda, Methods in Molecular Biology, vol 213, Humana press, Totowa, 2003.
- [5] Carbohydrate Analysis by Capillary Electrophoresis, A. Paulus, A. Klockow-Beck, Vieweg Verlag, Wiesbaden, 1998.
- [6] Aqueous normal phase chromatography: the bridge between reversed phase and hydrophilic interaction chromatography, J.J. Pesek, M.T. Matyska, in Hydrophilic Interaction Liquid chromatography (HILIC) and Advanced Applications, P.G. Wang, W. He, CRC Press, Boca Raton, 2011, chap. 1.
- [7] Reversed phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrates and glycoconjugates, Z. El Rassi, in Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol 66, Elsevier, Amsterdam, 2002, chap. 2.
- [8] H. Alwael, D. Connolly, B. Paull, Anal. Methods 3 (2011) 2668-2673.
- [9] Hydrophilic Interaction Liquid chromatography (HILIC) and Advanced Applications, P.G. Wang, W. He, CRC Press, Boca Raton, 2011.
- [10] HPLC of carbohydrates with cation and anion exchange silica and resin based stationary phases, C. W. Huck, C.G. Huber, G.K. Bonn, in Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol 66, Elsevier, Amsterdam, 2002, chap. 5.
- [11] Modern size exclusion chromatography of carbohydrates and glycoconjugates, S.C. Churms, in Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol 66, Elsevier, Amsterdam, 2002, chap. 8.
- [12] Carbohydrate analysis by LC and SFC using evaporative light scattering detection, M. Lafosse, M. Herbreteau, in: Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol. 66, Elsevier, Amsterdam 2002, chap. 30.
- [13] L.C. Nogueira, F. Silva, I. Ferreira, L.C. Trugo, J. Chromatogr. A 1065 (2005) 207-210.
- [14] M. Grembecka, A. Lebieńska, P. Szefer, Microchemical Journal 117 (2014) 77-82.
- [15] C.M. Zook, W.R. LaCourse, Current Separations 14 (1995) 48-52.
- [16] C. Corradini, A. Cavazza, C. Bignardi, Int. J. Carbohydrate Chem. (20112) article ID 487564 (13 pages).
- [17] D. Maury, F. Couderc, J. Czaplicki, J.C. Garrigues, V. Poinot, Biomed. Chromatogr. 24 (2010) 343-346.
- [18] D. J. Harvey, J. Chromatogr. B 879 (2011) 1196-1225.
- [19] K. R. Anamula, Anal. Biochem. 350 (2006) 1-23.
- [20] S. Honda, J. Chromatogr. A 720 (1996) 183-199.
- [21] S. Honda, K. Takehi, K. Fujikawa, Y. Oka, M. Takahashi, Carbohydr. Res. 183 (1988) 59-69.
- [22] E. Rogatsky, H. Jayatilake, G. Goswami, V. Tomuta, D. Stein, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 1805-1811.
- [23] T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2533-2542.
- [24] Capillary Electrophoresis and Electrochromatography of Carbohydrates, Z. El Rassi, in Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis, Z. El Rassi Ed., J. Chromatogr. Lib. vol. 66, Elsevier, Amsterdam 2002, chap. 18.
- [25] Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. From Monosaccharides to Complex Polysaccharides, N. Volpi Ed., Humana Press, Totowa, 2011.

- [26] Fluorophores and chromophores for the separation of carbohydrates by capillary electrophoresis, M. Breadmore, E. Hilder, A. Kazarian, in *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. From Monosaccharides to Complex Polysaccharides*, N. Volpi, Ed., Humana Press, Totowa 2011, chap. 2.
- [27] Analysis of simple carbohydrates by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry, C. W. Klampf, M. Himmelsbach, W. Buchberger, in *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. From Monosaccharides to Complex Polysaccharides*, N. Volpi Ed., Humana Press, Totowa, 2011, chap. 1.
- [28] S. Duteil, P. Gareil, S. Girault, A. Mallet, C. Feve, L. Siret, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1889-1898.
- [29] S. Rovio, Y. Kauhalusma, H. Simolin, *Electrophoresis* 28 (2007) 3129-3135.
- [30] S. Rovio, H. Simolin, K. Koljonen, H. Sirén, *J. Chromatogr. A* 11858 (2008) 139-144.
- [31] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, J-M. Mallet, P. Gareil, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7381-7387.
- [32] J.D. Oliver, M. Gaborieau, E.F. Hilder, P. Castignolles, *J. Chromatogr. A* 1291 (2013) 179-186.
- [33] J.D. Oliver, A.A. Rosser, C.M. Fellows, Y. Guillaneuf, J.L. Clement, M. Gaborieau, P. Castignolles *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 183-193.
- [34] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, J. Vial, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1351-1358.
- [35] Y. François, K. Zhang, A. Varenne, P. Gareil, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 164-170.

Conclusion

Les travaux présentés dans ces deux chapitres ont permis d'une part d'apporter un nouvel éclairage à l'analyse de la NC par CE-LIF après dérivation avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate et d'autre part de développer une méthode d'analyse des cellodextrines sans dérivation par CE avec une détection par absorbance UV en mode direct.

Afin d'obtenir une empreinte électrophorétique représentative des NC par CE-LIF, une étape de dépolymérisation en présence d'acide chlorhydrique fûmant à 50°C pendant 30 min a été introduite préalablement à l'étape de dérivation par l'APTS. Cette étape a permis de former des oligomères de plus faibles masses moléculaires que les NC initiales et présentant une meilleure solubilité dans le milieu de dérivation et dans l'électrolyte de séparation. Ainsi, le rendement global de dérivation a pu être amélioré et une empreinte plus caractéristique de l'ensemble du polymère a pu être obtenue. L'influence de la durée de la réaction de dérivation, de la température, de l'excès molaire d'APTS et de réducteur introduits sur les rendements de dérivation obtenus a été étudiée à partir d'étalons de cellodextrines présentant des degrés de polymérisation compris entre 3 et 7. Le meilleur compromis entre rendement de dérivation et durée de traitement a été obtenu à 70°C après 2 h de réaction et en introduisant un excès molaire d'APTS par rapport au nombre total de moles de cellodextrines introduit de 20 et un excès molaire d'agent réducteur (NaBH_3CN) par rapport à l'APTS de 20. Ensuite, les dérivés NC-APTS ainsi obtenus ont été analysés par CE-LIF en utilisant un électrolyte à base d'acide ϵ -aminocaproïque et d'hydroxypropylméthylcellulose dont la concentration a été optimisée. Ainsi, les empreintes électrophorétiques obtenues à partir de deux échantillons de NC non-explosives présentant des masses molaires moyennes en poids de 20 000 g/mol et de 312 100 g/mol ont pu être obtenues et comparées. Les oligomères majeurs obtenus après dépolymérisation en milieu acide ont été identifiés à l'aide d'étalons de cellodextrines après dérivation avec l'APTS. L'obtention de cellodextrines après dépolymérisation en milieu acide de NC a été confirmée par spectrométrie de masse à temps de vol avec ionisation-désorption par laser assistée par matrice (MALDI), en mode introduction directe. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune trace de dérivé nitré n'a pu être identifiée, démontrant qu'une dénitration accompagne, sinon précède, la dépolymérisation. Une identification plus poussée des composés mineurs apparaissant sur les empreintes pour chaque degré de polymérisation (voir par exemple la Figure III-I-8) par couplage CE-MS mériterait d'être effectuée afin de pouvoir réellement conclure sur l'intérêt pratique de cette approche d'un point de vue forensique.

Enfin, une méthode de séparation en milieu très basique de 7 cellodextrines (ayant des degrés de polymérisation compris entre 2 et 7) et de 8 carbohydrates pouvant être présents dans les matrices post-attentat et susceptibles d'interférer, a été développée et optimisée à l'aide d'un plan

d'expériences composite centré. La détection des carbohydrates a été réalisée en UV directe à 270 nm, suite à une réaction de photo-oxydation des carbohydrates dans la fenêtre de détection conduisant à la formation d'espèces intermédiaires absorbant à 270 nm. L'approche multivariée a permis d'étudier les effets de la conductivité et du pH de l'électrolyte sur la séparation (résolution et temps d'analyse) et la détection. La séparation des 15 carbohydrates d'intérêt et de l'acide naphthalènesulfonique utilisé comme étalon interne a été optimisée à l'aide d'une analyse de la désirabilité permettant de maximiser les résolutions entre 2 pics consécutifs tout en réduisant la durée de l'analyse. Les conditions optimales prédites par le modèle ont été déterminées puis validées expérimentalement et une séparation des 16 composés a été obtenue en 20 min avec des résolutions supérieures à 1 en présence d'un électrolyte constitué de NaOH 77,4 mM, de NaCl 183 mM et de polybrène à 0,1 g/L. Dans ces conditions, des CV compris entre 0,4 et 0,9% pour les temps de migration corrigés normalisés et entre 1,7 et 7,0% pour les aires corrigées normalisées ont été obtenus suite à 20 analyses successives. Cette méthode, plus rapide et moins coûteuse que l'analyse par CE-LIF, pourra être appliquée pour optimiser les conditions de dépolymérisation en milieu acide de la NC. Elle pourra permettre également d'obtenir une empreinte caractéristique d'un échantillon de NC donné et apporter des informations complémentaires à celles obtenues par CE-LIF. Cependant, en l'état, elle n'a pas pu être appliquée à l'analyse d'hydrolysats de NC à cause de sa trop faible sensibilité. Des méthodes de préconcentration électrocinétiques en ligne par isotachophorèse transitoire couplée à la séparation en mode zone (tITP-ZE) pourraient être envisagées afin d'améliorer les limites de détection obtenues.

**PARTIE IV : CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSICO-
CHIMIQUES MOLECULAIRES DE LA NITROCELLULOSE A PARTIR DE
L'INSTRUMENTATION DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE**

Introduction

Comme énoncé dans la partie bibliographique, il n'existe actuellement que très peu de méthodes d'analyse et de caractérisation moléculaire directe de la NC à cause de sa complexité chimique et structurale, l'indisponibilité d'étalons commerciaux bien caractérisés et son manque de solubilité dans les solvants couramment utilisés pour mettre en œuvre des techniques analytiques. Or, une caractérisation complète des échantillons de NC présente un grand intérêt forensique.

Nous avons donc amorcé une réflexion sur la recherche de nouveaux solvants susceptibles de solubiliser les NC explosives et non-explosives, et en particulier sur ceux qui seraient transparents dans l'UV. Cette réflexion nous a conduit à initier une collaboration avec le Prof. Jean-Marie Aubry, à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille. Cette partie rapporte tout d'abord les principaux résultats issus de cette collaboration, obtenus par Adrien Benazzouz dans le cadre de sa thèse par l'approche de Hansen. Cette approche a été appliquée pour analyser le profil de solubilité de 6 échantillons de nitrocellulose différents de part leurs taux de nitration et leurs masses moléculaires. Ainsi, de nouveaux mélanges à base d'acétonitrile et présentant des propriétés intéressantes pour la mise en œuvre de techniques analytiques ont pu être envisagés pour la solubilisation des NC.

Actuellement, dans la littérature, très peu de données portant sur la détermination des paramètres polymériques de la NC sont disponibles. La chromatographie d'exclusion stérique a été utilisée afin de déterminer les masses moléculaires moyennes (M_n et M_w) de cette macromolécule. Cependant, à cause du manque d'étalons commerciaux, une triple détection (réfractométrie, viscosimétrie et diffusion de lumière) doit être envisagée pour déterminer ces paramètres. Cette technique n'est actuellement pas disponible au Laboratoire Central de la Préfecture de Police (LCPP). Dans l'attente de l'émergence de nouveaux solvants, nous avons donc choisi un solvant classique, le THF, capable de solubiliser à la fois les NC explosives et les NC non-explosives, pour déterminer les propriétés moléculaires de masse des NC. Les avantages de l'électrophorèse capillaire (miniaturisation et automatisation), disponible au LCPP, ont été exploités pour réaliser des mesures de viscosités intrinsèques d'échantillons de NC non-explosives. Après extension aux NC explosives, ces mesures permettront la détermination de la masse moléculaire moyenne en poids d'échantillons de NC inconnues.

CHAPITRE I : Recherche d'un solvant solubilisant la nitrocellulose

Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé par Adrien Benazzouz (doctorant au Laboratoire de Chimie Moléculaire et Formulation EA 4478, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Lille).

1. Introduction

La nitrocellulose (NC) est un polymère obtenu après nitration de la cellulose avec un mélange d'acides sulfurique et nitrique. Les structures chimiques de la NC et de la cellulose sont très proches. Cependant, dans la structure chimique de la NC, les fonctions hydroxyle de la cellulose portées par les carbones C2, C3 et C6 sont remplacées par des fonctions nitro. Les propriétés physico-chimiques ainsi que les applications industrielles de la NC dépendent très fortement de son taux de nitration et de sa masse moléculaire [1,2]. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes d'analyses permettant de déterminer la masse moléculaire et le taux de nitration de la NC. Actuellement, il n'existe que très peu de méthodes analytiques permettant de caractériser la NC à cause notamment de son insolubilité dans l'eau et dans les solvants organiques usuels.

L'objectif de cette étude était d'analyser le profil de solubilité de 6 échantillons de nitrocellulose différents par leurs taux de nitration et leurs masses moléculaires. Pour cela, il a été envisagé d'utiliser l'approche de Hansen. Cette approche consiste à décrire les solvants selon 3 paramètres correspondants aux 3 interactions moléculaires principales : (i) les forces de dispersion (δ_d), (ii) les interactions polaires (δ_p) et (iii) les interactions relatives à la liaison hydrogène (δ_h) (les δ sont en $\text{MPa}^{1/2}$). Le paramètre de solubilité de Hildebrand (δ_H) peut ensuite être calculé à partir de ces 3 composantes selon l'équation (1).

$$\delta_H = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (1)$$

Les 3 paramètres de Hansen permettent ensuite de définir un espace tridimensionnel permettant de positionner tous les solvants et les solutés. En effet, le soluté est représenté par un point dans l'espace de Hansen, dont les coordonnées correspondent aux 3 paramètres de Hansen, entouré d'une sphère dite « de solubilité », dont le rayon est tel que seuls les solvants se trouvant dans la sphère de solubilité doivent conduire à la solubilisation du soluté. La sphère de solubilité permet ainsi d'identifier visuellement et rapidement les bons et mauvais solvants pour un soluté donné.

2. Matériels et produits

2.1. Etalons de nitrocellulose et solvants

Les étalons de nitrocellulose présentant des taux de nitration supérieurs à 12,5 % ont été donnés par le laboratoire Central de la Préfecture de Police. Les NC présentant des taux de nitration inférieurs à 12,5 % ont été achetées chez Dow Chemicals. Les taux de nitration et les masses moléculaires des différents étalons de nitrocellulose sont rassemblés dans le Tableau IV-I-1.

Tableau IV-I-1: Taux de nitration, degré de substitution, masse molaire et nature de l'agent mouillant utilisé pour la stabilisation des six étalons de nitrocellulose utilisés dans cette étude.

Code d'identification	Taux de nitration (%)	Degré de substitution	M _w (g/mol)	Propriété explosive	Agent mouillant
NC1	11,20	2,0	35 400	non	ethanol
NC2	11,20	2,0	137 600	non	ethanol
NC3	12,00	2,3	312 000	non	ethanol
NC4	12,20	2,3	28 700	non	ethanol
NC5	13,42	2,8	69 000	oui	eau
NC6	13,42	2,8	110 000	oui	eau

Les différents solvants utilisés pour déterminer le profil de solubilité des NC ont été utilisés sans purification supplémentaire et sont issus des principaux fournisseurs de solvants et de solvants verts (Acros, Aldrich, DRT, Novance ou Solvay).

2.2. Matériel

Les tests de solubilités ont été effectués à l'aide de l'appareil Intelli-Mixer RM-2L. Les pesées ont été réalisées à l'aide de micro-spatules antistatiques en polypropylène.

2.3. Préparation des solutions

Avant d'effectuer les tests de solubilité, les échantillons de NC ont été séchés par lyophilisation, ceci, dans le but de limiter l'influence de la présence d'eau sur les paramètres de Hansen. 10 mg de NC sèche ont été pesés dans un flacon ayant une contenance de 2 mL, puis 1 mL de solvant a été ajouté. Pour chaque étalon de NC, quarante échantillons ont été préparés à partir de 40 solvants différents. Les flacons ont ensuite été agités à 60 rpm pendant 24 h à température ambiante à l'aide de l'appareil Intelli-Mixer RM-2L.

3. Résultats et discussion

Après agitation, une note variant de 1 (solubilité totale de la NC dans le solvant) à 6 (aucun effet du solvant sur la NC) a été attribuée pour chaque flacon correspondant à un solvant différent (Tableau IV-I-2). Les données obtenues ont été ensuite retraitées à l'aide du logiciel HSPIP (Hansen Solubility

Parameters in Practice, version 4.0.05) permettant d'obtenir pour chaque NC les coordonnées (centre et rayon) de la sphère de solubilité. Le principe de calcul utilisé par le logiciel repose sur l'algorithme itératif suivant : (i) à partir des meilleurs solvants (note de 1), le barycentre de la sphère est recherché (point où se trouvent les meilleurs solvants), (ii) ce point est alors considéré comme le centre de la sphère et différentes valeurs de rayon sont testées pour trouver le rayon permettant d'obtenir la sphère contenant le maximum de solvant solubilisant la NC et d'exclure le maximum de solvants qui ne solubilisent pas la NC et (iii) plusieurs autres points de départ sont essayés jusqu'à ce que la sphère soit de la meilleure qualité possible. Les résultats obtenus pour chaque échantillon de NC sont présentés dans le Tableau IV-I-2. Le cas de la NC6 sera évoqué plus en détail car il s'agit de l'étalon de NC le plus difficile à solubiliser en raison de sa masse moléculaire et son taux de nitration élevés.

La différence relative d'énergie (RED) a été calculée pour chaque solvant et chaque NC selon l'équation (2).

$$RED = \frac{\Delta}{R} \quad (2)$$

Avec R le rayon de la sphère de solubilité et Δ la distance entre le solvant et le centre de la sphère dans l'espace de Hansen (calculée selon l'équation 3). Les résultats obtenus pour la NC6 sont présentés dans le Tableau IV-I-2.

$$\Delta = \sqrt{4(\delta_{d_{\text{solvant}}} - \delta_{d_{\text{soluté}}})^2 + (\delta_{p_{\text{solvant}}} - \delta_{p_{\text{soluté}}})^2 + (\delta_{h_{\text{solvant}}} - \delta_{h_{\text{soluté}}})^2} \quad (3)$$

Dans l'équation (3), le facteur 4 ne présente pas un sens physico-chimique. Il permet seulement de dilater l'axe δ_d et donc de donner la forme d'une sphère au volume de solubilité. En effet, en l'absence de ce terme, un volume en forme d'ellipsoïde serait obtenu. Les valeurs des paramètres de solubilités des solvants (δ_d , δ_p et δ_h) ont été obtenues dans la base de données publiée par Hansen et coll [3]. Les paramètres de solubilité du soluté ont été déterminés à partir des expériences présentées précédemment.

Ainsi, lorsque la différence relative d'énergie a une valeur inférieure ou égale à 1, le solvant se trouve à l'intérieur de la sphère de solubilité du soluté. Dans le Tableau IV-I-2, les valeurs de RED indiquées en vert indiquent les solvants ayant un comportement en accord avec leur positionnement dans la sphère de Hansen ($RED < 1,00$). Les valeurs indiquées en rouge indiquent les anomalies. Les valeurs indiquées en orange correspondent aux valeurs de RED obtenus pour les solvants se trouvant en bordure de la sphère de solubilité de la NC6.

Tableau IV-I-2: Paramètres de solubilité de chaque solvant (en MPa^{1/2}) et résultats des tests de solubilité des six échantillons de nitrocellulose (NC1 à NC6) et différence relative d'énergie (RED) pour la NC6. Notation variant de 1 (solubilité totale de la NC dans le solvant) à 6 (aucun effet du solvant sur la NC).

Solvant	δ_d	δ_p	δ_h	NC1	NC2	NC4	NC3	NC5	NC6	RED NC6
Cyclohexane	16,8	0	0,2	6	6	6	6	6	6	2,12
Diméthylformamide	17,4	13,7	11,3	1	1	1	1	1	1	0.20
1,4-Dioxane	17,5	1,8	9	1	1	4	4	6	6	1.48
Acétonitrile	15,3	18	6,1	1	1	1	1	5	5	0.99
Carbonate de propylène	20	18	4,1	1	1	1	1	1	1	1.02
Butan-2-one	16	9	5,1	1	1	1	1	1	1	1.03
Lactate d'éthyle	16	7,6	12,5	1	1	1	1	1	1	0.95
Benzaldéhyde	19,4	7,4	5,3	1	1	1	1	1	1	1.05
Formamide	17,2	26,2	19	6	6	6	6	6	6	1.81
Nitroéthane	16	15,5	4,5	1	1	1	1	1	1	0.91
Tétrahydrofurane	16,8	5,7	8	1	1	1	1	1	1	1.09
γ -Butyrolactone	18	16,6	7,4	1	1	1	1	1	1	0.50
Diméthylsulfoxyde	18,4	16,4	10,2	1	1	1	1	1	1	0.31
1-Bromopentane	16,6	4	3,8	6	6	6	6	6	6	1.49
Glycérol	17,4	11,3	27,2	4	6	5	6	6	6	2.04
Solketal	16,6	7,1	13,8	1	1	3	1	6	6	0.99
Triacétate de glycérol	16,5	4,5	9,1	1	1	1	1	2	2	1.22
Diméthyl 2-méthylglutarate	16,6	8,7	5	1	1	1	1	5	3	0.99
N,N-Diméthyl-décanamide	16,6	7,4	8,7	1	1	1	1	1	1	0.90
Alcool benzylique	18,4	6,3	13,7	3	4	3	4	5	5	1.00
Butan-1-ol	16	5,7	15,8	6	6	6	6	6	6	1.29
4-Méthylpentan-2-one	15,3	6,1	4,1	1	1	1	1	3	5	1.39
N-Méthyl-2-Pyrrolidone	18	12,3	7,2	1	1	1	1	1	1	0.45
2-Nitropropane	16,2	12,1	4,1	2	2	1	1	2	1	0.93
Polarclean	15,8	11	9,2	1	1	1	1	1	1	0.69
Carbonate de glycérol	17,9	25,5	17,4	1	1	1	2	3	3	1.13
Géraniol	16,8	3,6	8,3	6	6	4	5	6	6	1.32
Dimethyl Phthalate	18,6	10,8	4,9	1	1	1	1	2	2	0.79
Diacetone Alcohol	15,8	8,2	10,8	1	1	1	1	1	1	0.89
m-Xylène	17,8	2,7	2,8	5	6	4	6	5	5	1.65
Ethylène Glycol	17	11	26	5	6	5	6	6	5	1.92
Chloroforme	17,8	3,1	5,7	6	6	6	6	6	6	1.43
Sulfure de carbone	20,2	0	0,6	6	6	6	6	6	6	2.12
Dichlorométhane	17	7,3	7,1	6	6	6	6	6	6	0.94
Ethanol	15,8	8,8	19,4	6	6	6	6	6	6	1.36
Eau	15,5	16	42,3	6	6	6	6	6	6	3.89
Acétate d'éthyle	15,8	5,3	7,2	1	1	1	1	1	1	1.25
Acétone	15,5	10,4	7	1	1	1	1	1	1	0.88
Terpinolène	17,2	2	4,3	6	6	4	4	6	5	1.64
Cyclopentyl méthyl éther	16.7	4.3	4.3	6	6	6	6	6	6	1.43

Les données obtenues expérimentalement ont ensuite été retraitées à l'aide du logiciel HSPiP pour obtenir les sphères de solubilité. La sphère de solubilité pour la NC6 est présentée en vert en Figure IV-I-1.

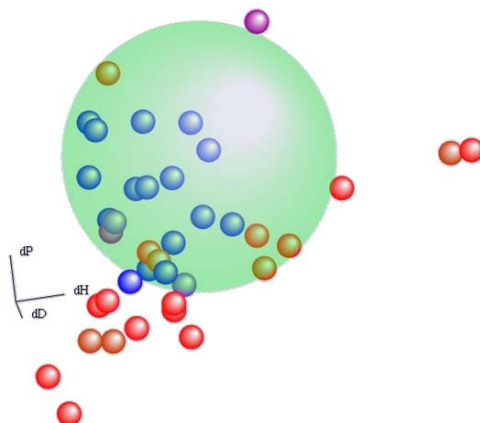


Figure IV-I-1: Sphère de solubilité de la NC6 (points bleus : notes 1-2, points oranges: notes 3-4 et points rouges : notes 5-6)

Les solvants présentés en bleu sont des bons solvants pour la NC6, les solvants présentés en couleur orange sont des solvants se trouvant à la limite de la sphère de solubilité et les solvants figurant en rouge correspondent à des solvants ne conduisant pas à la solubilisation de la NC6. La sphère de solubilité de la NC6 présente un rayon modéré ($8,3 \text{ MPa}^{1/2}$). Cependant, elle contient peu de solvants. Ce résultat peut s'expliquer par la position élevée du centre de la sphère sur l'échelle de polarité. Pour chaque échantillon de NC, les coordonnées des sphères de solubilités ont été déterminées et sont rassemblées dans le Tableau IV-I-3. Les valeurs obtenues expérimentalement confirment les valeurs obtenues par Hansen sur un échantillon de NC non caractérisé et publiées dans la littérature [4].

Tableau IV-I-3: Coordonnées des sphères de solubilité (δ_d , δ_p et δ_h) des différents étalons de NC et d'un échantillon de NC non caractérisé publié dans la littérature. R représente le rayon de la sphère de solubilité. Les valeurs des paramètres ont été obtenues à partir des notes (de 1 à 6) attribuées à partir des tests de solubilités réalisés puis du logiciel HSPiP (version 4.0.05).

NC	M_w (g/mol)	δ_d ($\text{MPa}^{1/2}$)	δ_p ($\text{MPa}^{1/2}$)	δ_h ($\text{MPa}^{1/2}$)	R ($\text{MPa}^{1/2}$)
NC1	35 000	15.0	14.6	8.5	12.7
NC2	137 000	16.0	17.0	9.3	11.5
NC3	312 000	16.5	14.9	9.2	10.3
NC4	29 000	15.4	18.6	6.5	13.8
NC5	69 000	18.4	14.4	11.0	8.5
NC6	110 000	18.1	13.9	10.5	8.3
Littérature	-	15.4	14.7	8.8	11.5

L'augmentation de la masse moléculaire de la NC entraîne une diminution du rayon de la sphère de solubilité. Cette diminution du rayon est encore plus marquée pour les NC hautement nitrées comme la NC5 et la NC6 traduisant une diminution de la solubilité des NC lorsque la masse moléculaire et le taux de nitration augmentent. La composante dispersive augmente avec la masse moléculaire des NC (sauf pour la NC5 et la NC6) ce qui est couramment observé pour les polymères. Cette composante augmente également avec le taux de nitration démontrant l'importance des forces dispersives des groupements nitro. Les effets de la polarité des NC restent plus difficiles à interpréter.

Pour mieux visualiser la position des différents échantillons de NC vis-à-vis des différents solvants utilisés, il est possible de les représenter selon 2 projections présentées en Figure IV-I-2 et Figure IV-I-3 qui mettent en évidence le caractère discriminant de la forte composante polaire des NC.

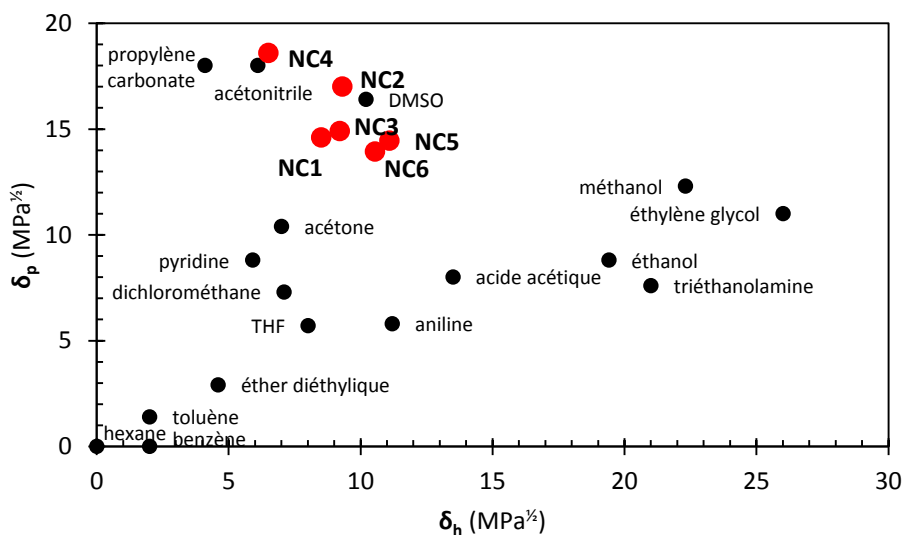


Figure IV-I-2: Positionnement des échantillons de NC vis-à-vis des différents solvants selon les composantes de Hansen δ_p et δ_h

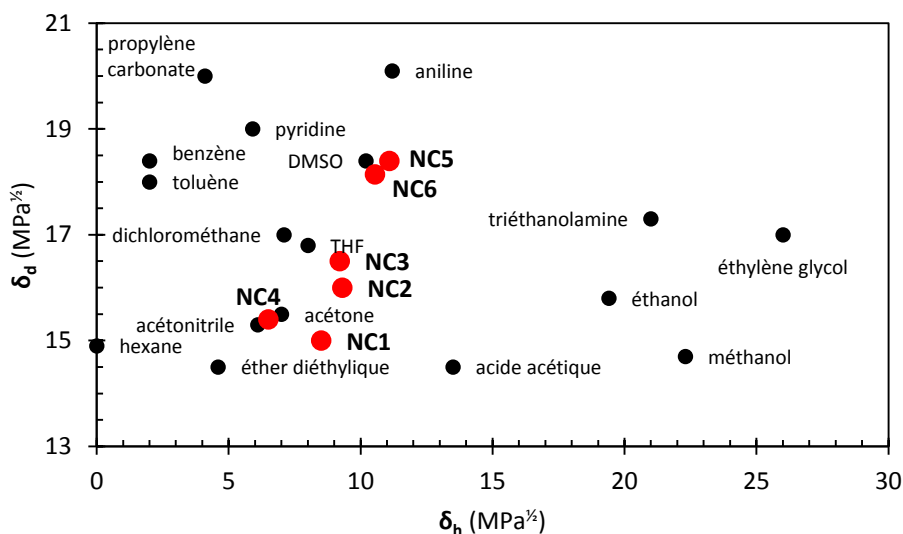


Figure IV-I-3: Positionnement des échantillons de NC vis à vis des différents solvants selon les composantes de Hansen δ_d et δ_h

A l'aide du logiciel, il est également possible de rechercher des solvants pouvant solubiliser la NC en fixant des critères sur les valeurs paramètres de Hansen qui doivent être respectés pour solubiliser les NC. Par exemple, pour la NC6, les critères qui ont été retenus sont les suivants :

$$\begin{aligned}15,1 &\leq \delta_d \leq 21,1 \\10,9 &\leq \delta_p \leq 16,9 \\7,5 &\leq \delta_h \leq 13,5\end{aligned}$$

Les critères sélectionnés (± 3) se justifient par plusieurs raisons : (i) le rayon de la sphère de solubilité de la NC est de 8 donc en conservant une valeur de ± 3 , uniquement les meilleurs solvants au centre de la sphère seront sélectionnés, (ii) d'après Hansen [3], les molécules dont les paramètres ne varient pas autour de $\pm 3 \text{ MPa}^{1/2}$ ont des propriétés solubilisantes comparables, (iii) d'après Benazzouz et coll [5] en retenant une valeur de $\pm 3 \text{ MPa}^{1/2}$, des solvants présentant des propriétés solubilisantes similaires et à la fois des structures chimiques variées sont retenus.

Ces critères ont permis de proposer une liste de solvants (appartenant ou non à la liste des 40 solvants testés) susceptibles de solubiliser la NC6 qui sont rassemblés dans le Tableau IV-I-4. Ces solvants n'ont pas été testés expérimentalement.

Tableau IV-I-4: Liste de solvants ainsi que leurs paramètres de Hansen (en MPa^{1/2}) pouvant solubiliser la NC6.

Solvant	CAS	δ_d	δ_p	δ_h
Anhydride acétique	108-24-7	16	12	10
2-Acétylthiophène	88-15-3	19	12	9,3
Allylthiocyanate	57-06-7	17	11	8,5
Anisaldéhyde	135-02-4	19	12	8,3
2-Butynedinitrile	1071-98-3	15	16	8
Chloro Acétaldéhyde	107-20-0	16	14	9
2-Chloropropenal	683-51-2	17	13	8,1
3-Chloropropionaldéhyde	19434-65-2	17	13	8,2
Dicétène	674-82-8	16	15	7,8
Diméthylformamide	68-12-2	17	14	11
Diméthylméthylphosphonate	756-79-6	17	13	7,5
Diméthylsulfoxyde	67-68-5	18	16	10
Ethylchloroformiate	541-41-3	16	11	8
Ethylthiocyanate	542-85-8	17	15	9
Ethylèneimine	151-56-4	18	11	9,8
2-Furonitrile	617-90-3	18	15	8,2
Glycérol carbonate acétate	1607-31-4	17	15	9,2
Hexaméthylphosphoramide	680-31-9	19	12	8,7
Isoxazole	288-14-2	19	13	11
3-Méthoxypropionitrile	110-67-8	17	14	7,8
Méthylcyanoacétate	105-34-0	17	15	9,9
Méthylglyoxal	78-98-8	16	16	9,7
1-Méthylimidazole	616-47-7	20	16	11
Méthylthiocyanate	556-61-6	17	16	10
3-Méthylisoxazole	30842-90-1	19	15	12
N,N-Diéthylacétamide	685-91-6	16	11	7,5
N,N-Diéthylformamide	617-84-5	16	11	9,2
N,N-Diméthylacétamide	127-19-5	17	12	9,4
2-Nitrothiophène	609-40-5	20	16	8,2
1,3-Propanesultone	1120-71-4	18	16	9
Pyrrole	109-97-7	19	11	10
2-Pyrrolidone	616-45-5	18	12	9
Spermidine	124-20-9	17	11	12
Tétraméthylènesulfoxyde	1600-44-8	18	11	9,1
Triéthylphosphate	78-40-0	17	11	9,2

Ces solvants ont été proposés à partir des paramètres de solubilités des NC présentés dans le Tableau IV-I-3 et des paramètres de solubilités des solvants données par Hansen [3]. L'équation (3) a ensuite été appliquée à 5000 solvants et les meilleurs solvants ont été retenus.

Les solvants permettant de solubiliser les NC faiblement nitrées et ayant une valeur de *cut-off* inférieure à 220 nm (tels que le diméthylisobutylcétone ou l'acétonitrile) ne permettent pas de solubiliser les NC hautement nitrées. Pour cela, il a été envisagé de mélanger deux non-solvants de ces NC ayant des valeurs de *cut-off* inférieures à 220 nm pour obtenir un mélange ayant une composition proche du centre de la sphère de solubilité de ces NC. Des mélanges à base d'acétonitrile apparaissent susceptibles de solubiliser des NC hautement nitrées ; ils sont présentés en Figure IV-I-4.

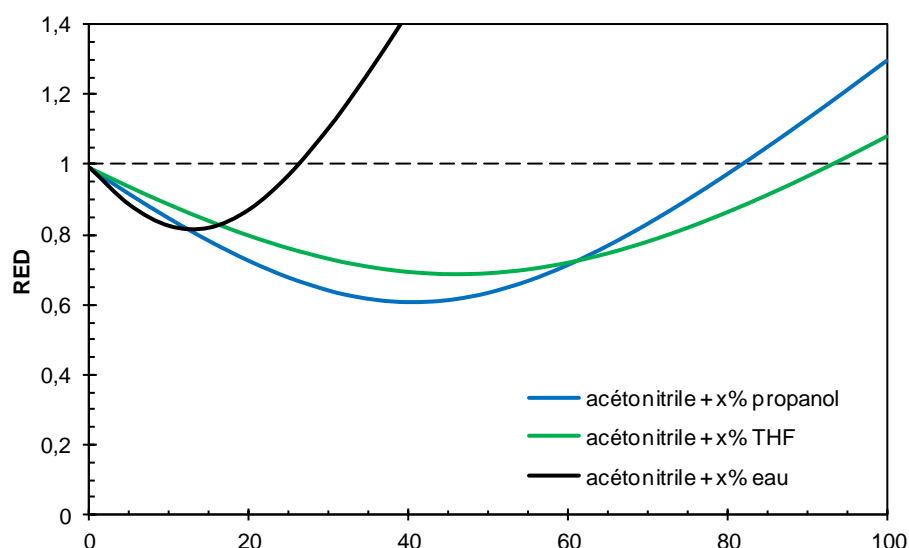


Figure IV-I-4: Evolution de la différence relative d'énergies (RED) pour des mélanges binaires de solvants à base d'acétonitrile en fonction du pourcentage de propanol, de THF et d'eau. Calculs effectués pour la nitrocellulose explosive NC6.

Les mélanges à base d'acétonitrile et de THF, d'acétonitrile et d'eau, et d'acétonitrile et de propanol apparaissent susceptibles de dissoudre la NC6. Expérimentalement, les mélanges constitués d'acétonitrile et d'eau n'ont pas permis de dissoudre la NC6. En revanche, la solubilisation rapide et totale de la NC6 a été obtenue dans un mélange constitué d'acétonitrile et de THF (50/50 v/v). De même, les mélanges constitués d'acétonitrile et de propan-1-ol (60/40 V/V) ont également permis de solubiliser totalement la NC6. Cependant, aucune solubilisation de la NC n'a été obtenue dans les mélanges constitués d'acétonitrile et d'isopropanol. Cela montre bien la difficulté de la prédiction des propriétés de solvation d'un solvant pour un soluté donné.

4. Conclusion

Au cours de cette étude, les profils de solubilité de 6 NC étalons différant par leurs taux de nitration et leurs masses moléculaires ont été étudiés en utilisant l'approche de Hansen. Comme indiqué dans la littérature, la solubilité des NC diminue lorsque le taux de nitration et la masse moléculaire augmentent. Parmi les solvants usuels, le DMSO, le THF et l'acétone peuvent être envisagés pour

dissoudre les NC quels que soient leurs taux de nitration. Enfin, cette étude a permis d'envisager de nouveaux mélanges de solvants solubilisant les nitrocelluloses explosives et ayant des propriétés intéressantes (longueur d'onde de *cut-off*) pour mettre en œuvre des techniques d'analyses de la NC avec une détection par absorbance UV directe telle que l'électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux (NACE), ou l'analyse par dispersion de Taylor, susceptible de permettre une détermination absolue des masses moléculaires, via la mesure de leur coefficients de diffusion.

Références

- [1] M.A. Fernández de la Ossa, M. López- López, M. Torre, C. García-Ruiz, Trends Anal. Chem. 30 (2011) 1740-1755.
- [2] C.W. Saunders, L.T. Taylor, J. Energy. Mater. 8 (1990) 149-201.
- [3] C.Hansen, Hansen solubility parameters: a user's handbook, 2nd ed. (2012), CRC Press: Boca Raton, FL.
- [4] C. Hansen, J. Paint Technol. 39 (1967) 104-117.
- [5] A. Benazzouz, L. Moity, C. Pierlot, M. Sergent, V. Molinier, J-M. Aubry, Ind. Eng. Chem. Res. 52 (2013) 16585-16597.

CHAPITRE II : Corrélation entre les masses molaires des nitrocelluloses et leurs viscosités intrinsèques mesurées avec l'instrumentation de l'électrophorèse capillaire

Correlating molar masses of nitrocelluloses with their intrinsic viscosities measured using capillary electrophoresis instrumentation

Elodie Alinat^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{1,3,4}, Xavier Archer², Pierre Gareil^{1,3,4*}

¹PSL Research University, Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

²Central Laboratory of Police Prefecture (LCPP), 75015 Paris, France

³CNRS, CBI, UMR 7195, 75005 Paris, France

⁴UPMC, Université Paris 6, 75005 Paris, France

Key words: *nitrocellulose, molar mass, intrinsic viscosity, capillary electrophoresis, Mark-Houwink parameters*

Abbreviations: capillary electrophoresis (CE), degree of substitution (DS), nitrocellulose (NC), tetrahydrofuran (THF).

Abstract

Specific viscosities were measured at 20 °C in tetrahydrofuran for a set of six nitrocellulose standards comprising three different mass-average molar masses (between 20,000 and 300,000 g mol⁻¹) for two different nitrogen contents (11.2 and 12.1%), using capillary electrophoresis instrumentation as a benchtop viscometer in frontal mode. Intrinsic viscosities were derived applying Huggins and Kraemer models, showing excellent convergence of both models at infinitely diluted polymer concentration. Good overall consistency was shown between viscosity data experimentally acquired by this protocol and the mass-average molar masses provided by the manufacturers. This simple protocol should be of interest for a better understanding of the solvent interaction given by this complex polymer, and beyond this, for tailoring NC solutions devoted to film deposition, and for the determination of weight average molar masses of unknown NC samples.

1. Introduction

Although various inorganic esters of cellulose can be produced, only nitrocellulose (NC) has become commercially available among these. This synthetic polymer is currently prepared by nitration of cellulose (obtained from wood or cotton) with nitric and sulfuric acids. Since cellulose nitration is an esterification reaction and therefore an equilibrium reaction, the degree of substitution (DS) and consequently the nitrogen content is governed by the composition of the acidic medium. In theory, it should be possible to replace all of the hydroxyl groups in cellulose by nitro groups corresponding to a degree of substitution of 3 and a nitrogen content of 14.14% [1,2]. However, in practice (including safety reasons), the DS cannot exceed 2.8, representing a nitrogen content of 13.8%. The physical and chemical properties and the industrial applications of NCs are determined by their nitrogen contents. Highly-nitrated NCs having a nitrogen content higher than 12.5% cannot be dissolved in alcohols whereas they are soluble in ketones and tetrahydrofuran. These NCs are the main component of explosive materials such as dynamites and smokeless gunpowders. NCs with a nitrogen content less than 12.5% are soluble in a wide variety of common organic solvents such as alcohols, esters, ketones, and tetrahydrofuran, and form films with interesting properties. Consequently, lowly-nitrated NCs are widely used in the manufacture of daily products such as varnishes, paints, lacquers, adhesives, and printing inks. Currently, NC manufacturers characterize NC samples by their nitrogen content (degree of substitution) [3-5], their molar mass [6-8] or directly their viscosity (related to their mass concentration) and their phlegmatizer content (damping agent or plasticizer).

Viscosity is an important parameter since, according to NC use, it affects the mechanical properties of coating films after it has dried, and it is often important to compare viscosity grades supplied by different manufacturers. Viscosity measurements are classically performed by measuring the flow rate of the liquid of interest in thermostated vertical glass tubes using a rinsing air bubble (Cochius method [4]) or a falling ball (ISO 14446 or ASTM D1343 methods). All these methods required several milliliters of samples to be performed and are not automated. Among the different devices available for viscosity measurements, capillary electrophoresis (CE) instrumentation has been used for viscosity determination in zonal [9, 10] or frontal modes [11].

Indeed, CE apparatus allows the realization of all the steps of the measurement protocol, including capillary rinsing, sample introduction, pressure application, temperature control, and diode array detection. As compared with other methods, the use of CE instrumentation for viscosity measurements presents advantages such as miniaturized operational conditions, and automation.

In this work, CE instrumentation was used as a bench-top viscometer in frontal mode to determine the specific viscosities in tetrahydrofuran of NC solutions prepared from non-explosive NCs having

various nitrogen contents and molar masses. Next, intrinsic viscosities were derived using Huggins and Kraemer equations, and then used to calculate Mark Houwink parameters, and radii of gyration. The parameters so obtained are of interest to later determine the mass-average molar masses of unknown NC samples.

2. Materials and methods

2.1. Standards

NC standards (Table IV-II-1) with a nitrogen content of 11.1% ($M_w = 20,000 \text{ g mol}^{-1}$) and 12.1% ($M_w = 95,000 \text{ g mol}^{-1}$) were given by the Central Laboratory of Police Prefecture (Paris, France). NC standards with nitrogen contents of 11.2% ($M_w = 35,500 \text{ g mol}^{-1}$ and $M_w = 137,600 \text{ g mol}^{-1}$), 12.0% ($M_w = 312,100 \text{ g mol}^{-1}$) and 12.2% ($M_w = 28,700 \text{ g mol}^{-1}$) were obtained from Dow Chemical (Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Germany). All these NCs are classified as non-explosive, since their nitrogen contents are lower than 12.5%. Accordingly, they were stored with ethanol as damping agent at a content of approximately 30%.

Table IV-II-1: Nitrogen content, substitution degree, and mass-average molar mass of the six studied NC standards.

Identification code	Nitrogen content (%)	Substitution degree	$M_w \text{ (g mol}^{-1}\text{)}$
NC1	11.1	2.0	20 000
NC2	11.2	2.0	35 000
NC3	11.2	2.0	137 000
NC4	12.0	2.3	312 000
NC5	12.1	2.3	95 000
NC6	12.2	2.3	29 000

Butyl acetate (anhydrous, $\geq 99\%$) and acetone ($\geq 99\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), and tetrahydrofuran (THF, analytical grade, 99.9% purity) was from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). They were used directly as received.

2.2. Instrumentation

All NC standards were dried with a Memmert oven model UNB100 (Mettler, Schwabach, Germany) to remove damping agent.

Viscosity measurements were performed with an Agilent HP3D capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a photodiode array (PDA) detector. This system automatically allows the realization of all the steps of the measurement protocol including capillary rinsing, sample introduction, pressure application, temperature control, and diode array detection. Instrument control and data acquisition were performed using Chemstation B.02.01 (Agilent

Technologies) software. Polymicro Technologies bare fused-silica capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France) with an inner diameter of 50 μm (outer diameter of 365 μm) and a total length of 30 cm were used in this study. The length from the capillary outlet to the detection window was fixed at 8.5 cm. The capillary cartridge was thermostated at 20°C. The polyimide coating at both ends of the capillary was removed. When not in use, the capillary was rinsed under 935 mbar for 15 min and stored in the apparatus both ends dipped in THF. The detection wavelength was 265 nm with the reference set at 400 nm and bandwidths set at ± 16 nm and ± 80 nm, respectively.

2.3. Sample preparation

Prior to use, a defined amount of NC was placed in weighted 2-mL glass flask and dried at constant weight in an oven at 100°C for 2 h to remove damping agent. Then, the flask containing dry NC was placed for 25 min in a glass desiccator to reach room temperature. The flask was weighted again to get the exact amount of NC. Then, 1 mL of THF was added, the flask was sealed, and the solution was gently stirred for 12 h with a magnetic bar and stored overnight at 4°C. Just before the positioning of the flasks on the sample carousel, 1 μL of acetone was added to the flasks containing the NCs as flow marker.

2.4. Experimental protocol for viscosity measurement

Before each measurement, capillary was rinsed with the solvent (THF) under 935 mbar for 10 min (100 capillary volumes). Then, the solution containing the NC and the marker (acetone) was allowed to flow through the capillary under a pressure of 50 mbar until the whole absorbance front of the marker was detected (frontal mode). For each NC sample, the whole measurement protocol was repeated three times with the same NC-containing flask. Three different concentrations were measured for each NC standard. Numerical data were processed using Excel® software (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

2.5. Viscosity calculations

For each NC solution, viscosity was derived from the time measurement at the inflection point of the absorbance front of the marker, t_{NC} . More precisely, the value for the specific viscosity η_{spe} was obtained applying Hagen-Poiseuille law, which, after integration and rearrangement, yields to:

$$\eta_{\text{spe}} = \frac{\eta_{\text{NC}} - \eta_{\text{solvent}}}{\eta_{\text{solvent}}} = \frac{d_c^2 \Delta P t_{\text{NC}}}{16 l^2 \eta_{\text{solvent}}} - 2 \frac{L}{l} \quad (1)$$

where η_{NC} is the viscosity of the NC solution, η_{solvent} the viscosity of the solvent used, d_c the inner diameter of the capillary, ΔP the pressure applied, L the total capillary length, and l the capillary length

to detection window. The specific viscosity can also be written in terms of the relative viscosity η_{rel} defined by the ratio $\eta_{NC}/\eta_{solvent}$ [12]:

$$\eta_{spe} = \frac{\eta_{NC} - \eta_{solvent}}{\eta_{solvent}} = \frac{\eta_{NC}}{\eta_{solvent}} - 1 = \eta_{rel} - 1 \quad (2)$$

Specific and relative viscosities were calculated applying equations (1, 2), depending on the NC concentration.

3. Safety considerations

NC in dry state is a highly flammable solid that ignites easily and burns explosively when it is concealed. This is why it should always be stored wet. NC can be ignited by flame, heat, shock, friction, sparks or static electricity. Its explosive propensity depends on the nitrogen content. The higher the nitrogen content, the easier it can explode. Special attention was paid to keep NC samples wet when stored in a refrigerator, and to weight them after drying in the desiccator, to avoid any shock. Security glasses and protection clothes were worn by the operator. In addition, weighing of dry matter was always performed under the assistance of a person equipped with a water vaporizer to prevent from any fire start. When used in solution in a volatile solvent and allowed to stand, especially, on the sample tray of a CE instrument, great attention should be paid so that solutions do not evaporate or spill internal parts of the instrument, in order to avoid any risk of spontaneous ignition later, upon applying high voltage.

4. Results and discussion

4.1. Choice of the NC solvent and capillary dimensions

The capillary dimensions (inner diameter and total length) and the applied pressure were optimized according to the NC characteristics and experienced concentration range to keep the breakthrough time of the NC within 2 to 10 min. Eventually, this was possible using a single capillary of 50 μm ID and 30 cm in length. Commonly used solvents for NCs such as THF, acetone, and butyl acetate were contemplated as potential solvents to generate intrinsic viscosity data for non-explosive NCs. Butyl acetate, however, was discarded since it does not allow to easily dissolve NC standards having nitrogen contents lower than 12% and its use for NC samples with nitrogen content greater than 12% leads to rather viscous solutions. Acetone was not retained, either, because it strongly absorbs UV light in a wide range of wavelengths. Eventually, THF, a low-viscosity (0.48 mPa s at 20°C), widespread solvent for synthetic macromolecules, and fitted with good UV transparency, was selected as a reference solvent to dissolve NCs and acquire these viscosity data. Concerning the operational

mode (zonal versus frontal), the frontal mode was preferred because it resulted in markedly shorter measurement times for the most viscous solutions, due to the fact in this mode, the viscosity within the capillary gradually increases from the solvent viscosity to that of the solution, whereas in the zonal mode, viscosity remains at its high level (i.e., solution viscosity) throughout the measurement. This protocol, however, might have been at the expense of data precision, insofar as viscosity is not constant over time within the capillary, and hence it was not possible to easily correct for applied pressure variations in the time course of an experiment, but obtained results showed quite satisfactory precision. Acetone was added to all NC solutions as a detection marker at a concentration of 0.1% (v/v). It was checked that over this content level, results were not significantly altered by the marker content. A typical absorbance recording of breakthrough curves is presented in Figure IV-II-1. These curves exhibited rather unexpected lowly dispersed sigmoidal shapes for a high molar mass polymer, made up of a sharp central part bracketed by more spread end parts. But it should be borne in mind that acetone here is the reporting species. The spreading of the end parts of these breakthrough curves might then reflect some interaction between acetone and NC chains.

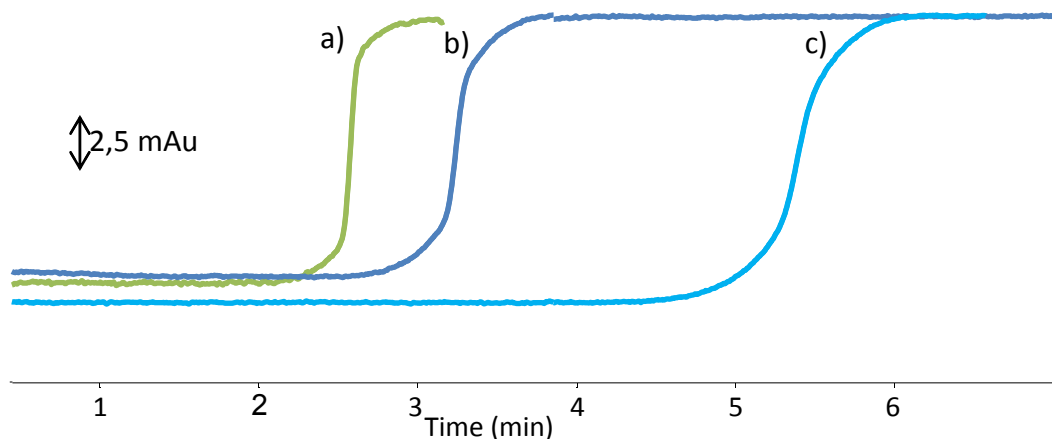


Figure IV-II-1: Typical breakthrough curve obtained from the percolation of three solutions of nitrocellulose NC4 in THF having concentrations of (a) 2 g L⁻¹, (b) 5 g L⁻¹, and (c) 10 g L⁻¹, and containing 0.1% (v/v) acetone. Bare fused-silica capillary 50 cm ID x 30 cm (detection window, 21.5 cm). Applied pressure: 50 mbar. Temperature : 20 °C. UV absorbance detection at 265 nm. The capillary was initially filled with neat THF.

4.2. Determination of NC intrinsic viscosity

The intrinsic viscosity $[\eta]$ of a polymer is defined as both the reduced viscosity η_{red} (η_{sp}/c ratio) or the inherent viscosity ($\eta_{\text{inh}} = \ln(\eta_{\text{rel}})/c$ ratio) of an infinitely diluted polymer solution:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln \eta_{\text{rel}}}{c} \quad (3)$$

where c is the massic concentration (often expressed in g dL⁻¹) of the polymer.

A classical procedure to determine the intrinsic viscosity based on equation (3) consists in measuring viscosity of solutions having different concentrations, followed by extrapolation of reduced viscosity and inherent viscosity to zero concentration. For dilute polymer solution, the relationship between reduced viscosity and concentration is linear and can be written as Huggins equation [12]:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad (4)$$

where k_H is the dimensionless Huggins constant, while the relation between the inherent viscosity and concentration is also linear and can be written as Kraemer equation [12]:

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{c} = [\eta] + k_K [\eta]^2 c \quad (5)$$

where k_K is the dimensionless Kraemer constant.

The intrinsic viscosity can be obtained as the common intercept of Huggins plot representing the reduced viscosity versus concentration and of Kraemer plot representing the inherent viscosity versus concentration. Frequently, the intrinsic viscosity is determined from a dual Huggins-Kraemer plot. A typical Huggins-Kraemer plot obtained for NC5 in THF is presented in Figure IV-II-2.

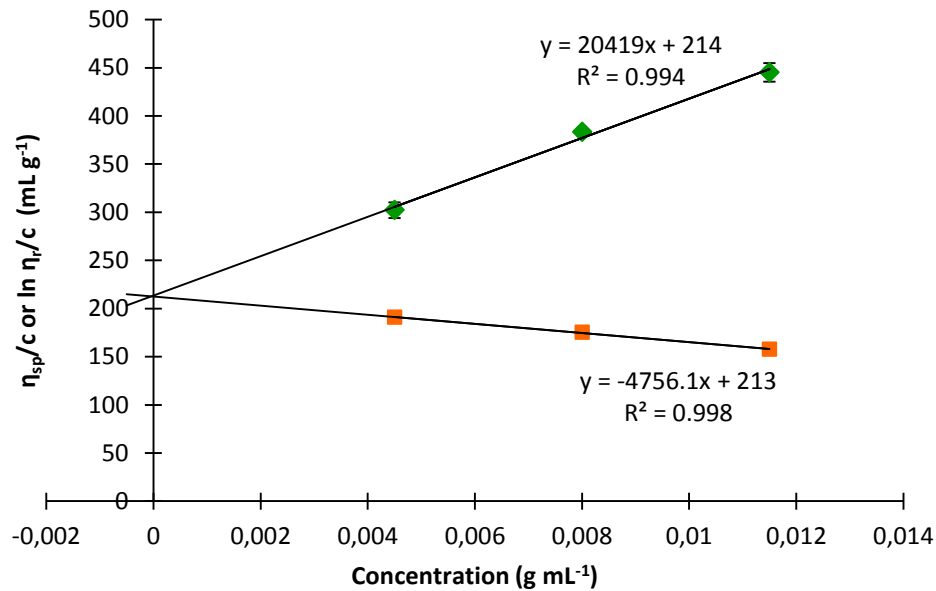


Figure IV-II-2: Huggins-Kraemer plots obtained for nitrocellulose NC5 in THF. Experimental conditions: see Figure IV-II-1. Error bars are hidden by the symbols.

For all the NC standards, good linear fits between the relative or specific viscosity and the concentration ($R^2 > 0.97$) were obtained. These linear plots indicate that under these conditions NC is completely dissolved in THF and that the selected range of concentrations is appropriate and testify

for the consistency of the experimental data. The values for the intrinsic viscosities obtained by linear least-squares fitting are listed in Table IV-II-2 for each NC standard. Very good consistency was obtained between Huggins and Kramer models. Higher values for the intrinsic viscosity indicate better solvent properties of THF with respect to the considered NCs.

Table IV-II-2: Intrinsic viscosities obtained from Huggins and Kraemer models for NC samples.

NC	Intrinsic viscosity obtained from Huggin model (mL/g)	Intrinsic viscosity obtained from Kraemer model (mL/g)
NC1	44.0	49.9
NC2	48.8	52.6
NC3	192.8	170.8
NC4	56.0	54.4
NC5	213.6	212.6
NC6	287.1	289.1

The calculation of the intrinsic viscosity is an intermediate step to determine the Mark-Houwink parameters of the NC standards.

4.3. Calculation of Mark-Houwink parameters

The Mark-Houwink parameters were obtained by fitting the set of mass-average molar masses given by the two manufacturers and the preceding intrinsic viscosities experimentally determined by CE instrumentation to the Mark-Houwink-Sakurada equation:

$$[\eta] = KM_w^a \quad (6)$$

where K and a are the Mark-Houwink constants in a given solvent at a fixed temperature and M_w the mass-average molar mass. Therefore, log-log plots of the intrinsic viscosity as a function of molar mass should yield a straight line with an intercept equal to $\log(K)$ and a slope equal to "a", the values of which will depend on the temperature, on the polymer nature, and on the solvent chosen. A typical log-log plot of the intrinsic viscosity as a function of molar mass for NCs having a nitrogen content of 11.2% is presented in Figure IV-II-3.

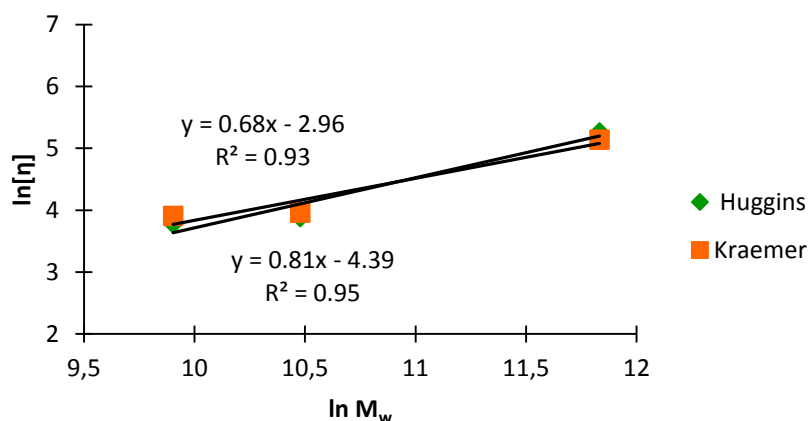


Figure IV-II-3: Plot of $\ln[\eta]$ versus $\ln M_w$ for NC standards having a nitrogen content equal to 11.2 in THF at 20 °C. The intrinsic viscosities were obtained from Huggins and Kraemer models. Least-squares regression equations: $y = 0.81x - 4.39$ ($R^2 = 0.95$) using Huggins model; $y = 0.68x - 2.96$ ($R^2 = 0.93$) using Kraemer model.

The Mark Houwink parameters obtained from Huggins and Kraemer models for NC standards having nitrogen contents of 11.2% and 12.1% are presented in Table IV-II-3.

Table IV-II-3: Mark Houwink parameters obtained from Huggins and Kraemer models for NC samples having nitrogen content close to 11.2% and 12.1%.

Nitrogen content (%)	a		K	
	Huggins's model	Kraemer's model	Huggins's model	Kraemer's model
11.2	0.81	0.68	0.012	0.052
12.1	0.69	0.70	0.058	0.049

The value of exponent “a” gives information about the polymer/solvent interactions and polymer stiffness. Generally, “a-value” ranges from 0.5 for a theta solvent to 0.8 for a good solvent. A value of “a” between 0.5 and 0.8 describes a flexible polymer chain in an ideal solvent. A value of “a” greater than 0.8 indicates a stiff polymer. For both nitrogen contents studied, the a-values calculated from Huggins model are in agreement with those obtained from Kraemer model. As far as the nitrogen content is concerned, an increase in nitrogen content seems to result in a decrease in a-value and an increase in K-value, which can be understood as a decrease in polymer stiffness upon increasing the nitrogen content, due to less internal hydrogen bonds, and/or possibly a decrease in polymer/solvent interaction. Few data on NC are available in the literature for the sake of comparison, and most of the time, the nitrogen content is not precised [13]. Most measurements were performed in acetone, but the discrepancy between the a-values (0.78-1.00) did not permit to reveal any influence of temperature and nitrogen content. For explosive NCs having 12.9 and 13.9 nitrogen contents, a-values of 0.90 and 0.91, respectively, are reported in acetone at 25 °C. The single data available for THF gave a-values of 0.80-0.84 (20 °C) for a series of NCs having molar masses in the range 26 000-270 000.

Once the relationship between the intrinsic viscosity and the weight-average molar mass was established for a given polymer/solvent system at a given temperature, the weight-average molar mass of an unknown NC sample can be easily obtained by performing intrinsic viscosity measurements in this solvent at this temperature.

4.4. Estimation of radius of gyration

The radius of gyration which corresponds to the root mean square distance between any point of the polymer chain and its center of mass can be calculated from the Mark-Houwink parameters according to equation (7):

$$R_g = \left(\frac{K}{6^{3/2} \phi} \right)^{1/3} M_w^{(a+1)/3} \quad (7)$$

where ϕ is Flory-Fox constant ($2,1 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ for unfractionated polymers [13]). The obtained radii of gyration for all the NC standards studied are presented in Table IV-II-4. Figure IV-II-4 shows the plot of these calculated radii of gyration as a function of the weight average molar masses given by the manufacturers of these NC standards. The very good non-linear correlation obtained again suggests the high consistency between the weight-average molar masses given by the two different manufacturers of these NC standards and the intrinsic viscosities measured experimentally. Figure IV-II-4 also points to the rather slight influence of the nitrogen content of the NC as the six data points pertaining to NCs having different nitrogen contents (11.2 and 12.1) can be fitted with a single curve.

Table IV-II-4: Radii of gyration obtained from the Mark-Houwink parameters for NC standards having nitrogen content close to 11.2% and 12.1%.

$M_w(\text{g mol}^{-1})$	Nitrogen content (%)	$R_g(\text{nm})$	
		Huggins model	Kraemer model
20 000	11.2	6.3	6.7
35 000		8.8	9.2
137 000		20.1	19.7
29 000	12.1	8.9	8.7
95 000		17.5	17.1
312 000		34.1	33.5

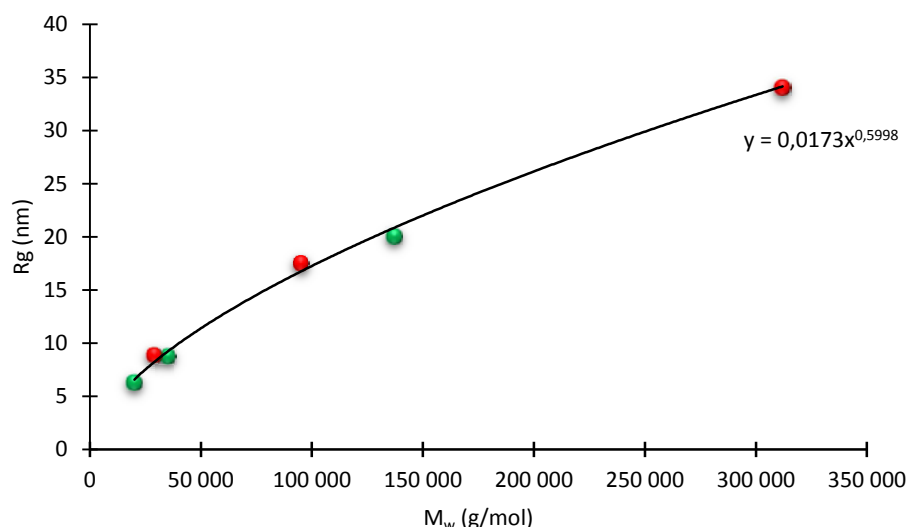


Figure IV-II-4 : Plot of the radius of gyration (obtained from Huggins model) of standard non-explosive nitrocelluloses calculated from the Flory-Fox equation and experimental intrinsic viscosity data versus the mass-average molar mass of standard NCs given by the manufacturers. Green and red circles represent data points pertaining to NCs having 11.2% and 12.1% nitrogen content, respectively.

5. Conclusion

This work shows the feasibility of implementing viscosity measurements of non-explosive nitrocellulose solutions using CE instrumentation, providing automation and measuring time effectiveness. From the described protocol, intrinsic viscosities were derived applying Huggins and Kraemer models, showing excellent convergence of both models at infinitely diluted polymer concentration. Likewise, intrinsic viscosity data and radii of gyration were obtained at 20 °C with THF as solvent for a set of six NC standards comprising three different mass-average molar masses (between 20,000 and 300,000 g mol⁻¹) for each one of two different nitrogen contents (11.2 and 12.1%). Good overall consistency was shown between viscosity data experimentally acquired by this CE protocol and the weight-average molar masses provided by the two manufacturers of these NC standards. As expected, Mark-Houwink parameters seem to depend on NC nitrogen content, which brings a deeper insight into the understanding of NC/solvent interactions. Once these parameters are determined for NCs of given nitrogen content, they in turn can be used to obtain the unknown weight average molar mass of a NC sample. Alternatively, a coarse value of the molar mass can also be obtained from a calibration curve established with NC standards ignoring their nitrogen contents. This approach is especially of interest for non-explosive NCs, as a tool for tailoring film properties, but it

can be as well extended to explosive NCs, provided that proper experimental care is taken to insure safe operation.

References

- [1] M.A. Fernández de la Ossa, M. López- López, M. Torre, C. García-Ruiz, Trends Anal. Chem. 30 (2011) 1740-1755.
- [2] C.W. Saunders, L.T. Taylor, J. Energy. Mater. 8 (1990) 149-201.
- [3] GEMO FN-102-A-1 (1989).
- [4] Dow Wolf Cellulosics, Nitrocellulose (téléchargé en août 2012 sur http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_08a6/0901b803808a680d.pdf?filepath=/822-00007.pdf&fromPage=GetDoc).
- [5] M. López-López, J.M. Ramiro Alegre, C. García-Ruiz, M. Torre, Anal. Chim. Acta 685 (2011) 196-203.
- [6] G. Heinzmann, Int. Annu. Conf. ICT. 33rd. 2002, 58, 1-5.
- [7] A. F. MacDonald, Int. Annu. Conf. ICT. 34th. 2003, 126, 1-10.
- [8] P.R. Deacon, A.F. MacDonald, P.P. Gill, N. Mai, M. Bohn, H. Pontius, Int. Annu. Conf. ICT. 39th. 2008, 68, 1-12.
- [9] J. Tjørnølund, S.H. Hansen, J. Biochem. Biophys. Methods 38 (1999) 139-153.
- [10] Y. François, K. Zhang, A. Varenne, P. Gareil, Analytica Chimica Acta 562 (2006) 164-170.
- [11] M.S. Bello, R. Rezzonico, P.G. Righetti, J. Chromatogr. A 659 (1994) 199-204.
- [12] F. Behrouziana, S. M.A. Razavi, H. Karazhiyan, Food Hydrocolloid. 35 (2014) 100-105.
- [13] Polymer Handbook, J.Brandrup, E. H. Immergut, and E. A. Grulke Ed., 4th edition, Wiley, New York, 2003.

Conclusion

Lors de cette étude, une recherche de nouveaux solvants permettant la solubilisation de différentes NC étalons a été menée. Les tests de solubilité ont été réalisés à partir de 40 solvants et sur 4 NC étalons non-explosives et sur 2 NC étalons explosives. Afin d'étudier la solubilité des NC, l'approche de Hansen consistant à décrire les solvants selon 3 paramètres correspondants aux 3 interactions moléculaires principales a été mise en œuvre. Cette approche a permis de définir pour chaque NC étalon une sphère de solubilité. Les solvants se trouvant à l'intérieur de cette sphère sont considérés comme étant des solvants utilisables pour la dissolution des NC. Comme attendu, une diminution du rayon de la sphère de solubilité a été obtenue lorsque la masse moléculaire et le taux de nitration de la NC augmentent. Les solvants les plus transparents en UV (tels que l'acétonitrile) ont été sélectionnés parmi les solvants permettant de solubiliser les NC faiblement nitrées. Cependant, ces solvants ne permettent pas de solubiliser les NC explosives. Afin de solubiliser les NC explosives, des mélanges de solvants ayant une grande transparence en UV ont été envisagés. Ainsi, des mélanges préparés à base d'acétonitrile et de THF ou de propan-1-ol ont permis la solubilisation des NC non-explosives et des plus hautement nitrées. L'utilisation de ces mélanges de solvants ouvre de nouvelles perspectives pour mettre en œuvre de nouvelles techniques pour analyser la NC. Il pourrait alors être envisageable d'utiliser l'électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux et très basique (pour déprotonner les fonctions hydroxyle résiduelles) pour analyser la NC en utilisant une détection UV directe.

Ensuite, l'appareillage de l'électrophorèse capillaire a été utilisé pour réaliser des mesures de viscosité. Contrairement aux techniques actuellement employées, avec un appareil de ce type, ces mesures sont entièrement automatisées et miniaturées. A partir de ces mesures de viscosité, les viscosités intrinsèques ont été déterminées en utilisant les modèles de Huggins et Kraemer. Ainsi, la convergence de ces deux modèles a été démontrée et la faisabilité de ces mesures a été démontrée pour des NC non-explosives. Il reste à l'étendre à des NC explosives. Des mesures de précaution devront être prises afin de s'assurer de ne pas générer des dépôts solides de NC à l'intérieur de l'appareil d'électrophorèse capillaire, liés à une évaporation du solvant, qui seraient susceptibles de s'enflammer spontanément lors d'une application ultérieure d'un champ électrique dans l'appareil. Comme cela a été montré, les viscosités intrinsèques ainsi obtenues pour des NC étalons pourront être utilisées pour calculer les paramètres de la relation de Mark-Houwink qui permettront à l'inverse d'obtenir, après détermination de leur taux de nitration, les masses moléculaires moyennes en poids d'échantillons de NC inconnues. L'ensemble de ces données devrait permettre d'apporter un

complément d'information pour la caractérisation d'échantillons de NC et donc présenter un intérêt forensique pour déterminer la provenance d'échantillons de NC inconnues.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, de nouvelles méthodes analytiques permettant la caractérisation de nitrocelluloses (NC) par électrophorèse capillaire (CE) ont été développées.

Dans une première partie, de nouvelles méthodes d'analyse utilisant la CE ont été développées afin de déterminer le taux de nitration d'échantillons de NC et donc *a fortiori* de discriminer les NC explosives des NC non-explosives. Dans ces différentes méthodes, la détermination du taux de nitration est basée sur la quantification des ions nitrite et des ions nitrate libérés après dénitrification alcaline de la NC. Pour cela, une méthode d'analyse par CE des ions nitrite et nitrate a été développée et validée pour l'analyse de matrices très basiques telles que des hydrolysats de NC. Ainsi, les ions nitrite et nitrate ont pu être analysés en moins de 3 min avec des CV inférieurs à 0,05% pour les temps de migration normalisés et de 0,8% (ions nitrite) et 0,7% (ions nitrate) pour les aires corrigées normalisées, suite à 20 analyses successives d'hydrolysats de NC. Il a également été démontré statistiquement qu'aucun effet de matrice ne se produisait en présence d'échantillons très basiques. Cette méthode validée pourrait donc avoir des applications dans d'autres domaines que celui visé ici. Ensuite, les conditions de dénitrification (concentration de la soude, température et durée) de la NC en milieu basique ont été optimisées à l'aide d'une approche multivariée (plan d'expérience de type composite centré) afin de maximiser les rendements de dénitrification des NC explosives et non-explosives. Une telle approche n'avait jamais été utilisée. Suite au traitement chimiométrique des données, une différence de comportement liée à leur différence de propriétés physico-chimiques entre les NC explosives et les NC non-explosives a été observée. Ainsi, les conditions d'hydrolyse alcaline permettant d'obtenir les rendements de dénitrification les plus élevés pour les 2 catégories de NC ont été déterminées. Par ailleurs, une nouvelle méthode plus rapide, plus précise et moins dangereuse permettant de déterminer le taux de nitration des NC à partir du ratio molaire des concentrations en ions nitrite et en ions nitrate libérés après hydrolyse alcaline a été mise au point. En effet, au cours de cette étude, il a été démontré l'existence d'une corrélation linéaire entre le ratio molaire des concentrations en ions nitrite et en ions nitrate et le taux de nitration de la NC. Afin d'expliquer cette corrélation linéaire, un nouveau mécanisme de dénitrification en milieu alcalin de la NC a été proposé (collaboration avec Jean-Maurice Mallet, Ecole Normale Supérieure de Paris). Logiquement, cette méthode, dite du ratio, devrait remplacer avantageusement les méthodes chimiques anciennes (méthode de Devarda et méthodes dérivées) et devenir la méthode de choix pour le contrôle précis du taux de nitration des NC explosives et non-explosives dans l'industrie, à côté de la méthode par spectrométrie infrarouge utilisable surtout pour les NC non-explosives. Les différentes méthodes permettant de déterminer le taux de nitration de la NC après hydrolyse en milieu basique ont finalement été appliquées avec succès à la détermination du taux de nitration de NC contenues

dans des poudres propulsives ainsi que dans des produits usuels (vernis à ongles, pansement liquide, balle de ping-pong et membrane). Ces méthodes ont permis d'obtenir des précisions et exactitudes comparables à celles obtenues par les méthodes actuellement utilisées dans l'industrie pour déterminer le taux de nitration de la NC.

Dans une deuxième partie, à l'instar d'une approche couramment employées en analyse protéomique (caractérisation de protéines à partir d'une empreinte peptidique), l'analyse de la NC par électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence induite par laser (CE-LIF) après dépolymérisation partielle en milieu acide et dérivation avec le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) a permis d'obtenir une empreinte électrophorétique caractéristique de la NC. Après avoir optimisé les conditions de dérivation et les conditions de séparation par CE, les produits de dépolymérisation de la NC obtenus ont été identifiés à l'aide d'étalons de cellodextrines, qui présentent le même enchaînement (β -1,4) entre les unités glucopyranose que la NC, et par spectrométrie de masse (MS) en mode d'ionisation-désorption par laser assisté par matrice (MALDI) (collaboration avec Régis Daniel, Université d'Evry-Val d'Essonne). Cette confirmation d'identification par MS a été obtenue en mode d'introduction directe. La mise au point d'un couplage CE-MS, plus facile à réaliser avec une source d'ionisation par électro-nébulisation (ESI), voire avec une source à injection directe en temps réel (DART) (discussions avec le Dr Maxime Bridoux CEA-DAM Bruyères-le Chatel), permettrait d'identifier un bien plus grand nombre de composés de l'empreinte électrophorétique (par exemple des oligosaccharides encore partiellement nitrés ou des impuretés provenant de la cellulose utilisée au départ pour la fabrication de la NC), ce qui serait du plus grand grand intérêt pour une enquête judiciaire. Il s'agit là d'une perspective primordiale de ce travail. De plus, dans l'objectif d'analyser les produits de dépolymérisation de la NC sans étape de dérivation, une méthode alternative d'analyse par CE des cellodextrines sans dérivation en utilisant un électrolyte très basique et une détection par absorbance UV en mode direct, induite après réaction photochimique des analytes dans la fenêtre de détection, a été développée. L'optimisation de cette méthode de séparation a été réalisée sur un mélange de 15 carbohydrates (dont 7 cellodextrines et 8 autres mono- ou disaccharides susceptibles d'être présents dans les échantillons collectés après attentat) et à l'aide d'un plan d'expérience de type composite centré, en considérant 2 facteurs (concentration de la soude et conductivité de l'électrolyte). La séparation du mélange des 15 carbohydrates et de l'acide naphthalènesulfonique utilisé comme étalon interne a été réalisée en seulement 20 min en utilisant un électrolyte constitué de soude, de chlorure de sodium et de polybrène (ce dernier, permettant d'opérer en mode co-électroosmotique, et donc d'accélérer l'analyse). Jamais les cellodextrines n'avaient été séparées avec une aussi bonne résolution. Cependant, cette méthode d'analyse, beaucoup plus rapide que la méthode impliquant la dérivation préalable des échantillons (2 h) et moins

onéreuse que celle-ci (réactif, matériel), n'a pas pu être appliquée en l'état à l'analyse d'hydrolysats de NC pour obtenir une empreinte électrophorétique, à cause de sa trop faible sensibilité (la spectrophotométrie d'absorbance remplaçant la spectrophotométrie de fluorescence). Cependant, des méthodes de préconcentration électrocinétiques en ligne par isotachophorèse transitoire couplée à la séparation en mode zone (tITP-ZE) pourraient être envisagées afin d'améliorer les limites de détection obtenues. La présence dans les produits d'hydrolyse acide d'une concentration élevée d'ions chlorure et dans l'électrolyte de séparation d'une concentration élevée d'ions hydroxyde pourrait s'avérer favorable à la mise en œuvre d'une telle technique (l'une ou l'autre de ces espèces pouvant jouer le rôle d'ion meneur pour l'étape de préconcentration isotachophorétique). Actuellement, et pour des questions de sécurité des manipulations au laboratoire, les conditions de dépolymérisation acide de la nitrocellulose n'ont été optimisées dans un premier temps que pour des NC non-explosives, en utilisant la méthode CE-LIF comme méthode d'analyse. Il reste donc à compléter cette étude sur la dépolymérisation avec des étalons de NC explosive. En fonction des besoins en sensibilité, l'une (CE-LIF) ou l'autre (CE-UV) des méthodes d'analyse pourra être utilisée.

Dans une dernière partie, plus prospective, nous nous sommes intéressés aux méthodes permettant une caractérisation moléculaire directe des NC. De ce point de vue, une réflexion a été engagée sur les limitations au développement de méthodes pour l'analyse et la caractérisation directe des NC qui résultent du nombre limité de solvants capables de les solubiliser, et notamment de solvants fortement transparents dans l'UV. Nous avons donc initié une collaboration avec le prof. Jean-Marie Aubry (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille) qui a utilisé l'approche de Hansen afin d'étudier la solubilité de 6 échantillons de NC présentant des masses molaires et des taux de nitration différents dans 40 solvants. Ainsi, les NC les moins nitrées ont pu être solubilisées dans des solvants présentant une faible absorbance dans l'UV tels que l'acétonitrile. En ce qui concerne la solubilisation des NC explosives, des mélanges de solvants préparés à base d'acétonitrile et de THF ou de propan-1-ol et ayant une grande transparence en UV ont été envisagés. Il reste actuellement à établir que ces solvants, ou mélanges de solvants, permettent une détection des NC dans le bas UV par absorbance UV directe, ce qui serait évidemment un atout considérable pour mettre en œuvre de nouvelles méthodes de séparations électrophorétiques ou chromatographiques, avec détection par absorbance UV directe. Il serait alors intéressant d'étudier si l'on ne peut pas ioniser négativement plus ou moins les NC selon leur taux de nitration et d'obtenir ainsi une empreinte moléculaire par électrophorèse en milieu non-aqueux. Par ailleurs, l'instrumentation miniaturisée et automatisée de l'électrophorèse capillaire a été utilisée afin de déterminer la viscosité intrinsèque des NC, qui donnent accès à une caractérisation moléculaire par la taille. Les essais ont été réalisés uniquement avec des NC non-explosives, en raison des contraintes de sécurité. Le THF a été choisi comme solvant car il solubilise

très bien toutes les NC et en raison de sa popularité pour les études de polymères. Le problème de son absorbance dans le bas UV, masquant celle des NC, a été résolu en utilisant un marqueur absorbant. La bonne convergence du traitement de données à partir des modèles de Huggins et de Kraemer atteste de la qualité des mesures de vitesse d'écoulement effectuées en mode frontal (plus rapide que le mode zone). Les valeurs des viscosités intrinsèques ainsi obtenues pour des étalons de NC non-explosives ont permis de calculer les paramètres de la relation de Mark-Houwink. Il serait intéressant d'effectuer des mesures de viscosité similaires pour des NC explosives, afin de constituer une base de données complète pour l'ensemble des NC. Cette base permettrait, à l'inverse, d'obtenir, après détermination de leur taux de nitration, les masses molaires moyennes en poids d'échantillons de NC inconnues. De telles données complémentaires sur les masses molaires permettraient de mieux caractériser les échantillons de NC inconnues et présenteraient donc un intérêt forensique. Notons enfin, en liaison avec la détermination de la dimension moléculaire à partir de mesures de viscosités, que la découverte d'un solvant suffisamment transparent dans l'UV permettrait de mettre en œuvre la méthode de Taylor, qui constituerait une autre approche pour déterminer, de façon absolue, la dimension moléculaire des NC, à partir cette fois de leur coefficient de diffusion.

En ce qui concerne les perspectives apportées par les autres techniques analytiques, le potentiel de la chromatographie bidimensionnelle (exclusion x partage à polarité de phases inversée), explorée à Amsterdam, méritera d'être surveillé. Suite à nos discussions avec Le Dr Maxime Bridoux, nous avons commencé à tester nous-même au CEA-DAM le potentiel de la spectrométrie de masse haute résolution couplée à une source d'ionisation ambiante (DART) qui pourrait permettre de discriminer les échantillons de NC selon leur taux de nitration. Une analyse en composante principale (ACP) des différents spectres de masse obtenus pour des étalons de NC différant par leur taux de nitration et par leur masse molaire est en cours.

Les nouvelles méthodes précédentes pourront être directement appliquées à des échantillons de NC industriels et à des saisies judiciaires. Afin de les appliquer à des échantillons d'explosifs formulés, ou collectés sur site d'attentat, des méthodes d'extraction appropriées devront être développées. Pour notre part, dans le cadre de cette thèse, nous avons été amenés à considérer l'extraction de la NC dans des formulations explosives de type simple base. Pour la détermination du taux de nitration, la méthode du ratio, que nous avons mise au point, nous a permis de simplifier le protocole décrit dans un article récent. Pour des raisons de sécurité, et en absence d'une formation suffisante, nous n'avons pas été autorisés à manipuler des échantillons de formulations double-base et triple-base. Les protocoles d'extraction de la nitrocellulose à partir d'échantillons collectés après attentat pourront s'inspirer de celles décrites pour les explosifs formulés, mais devront être dûment testées.

ANNEXES

ANNEXE A : L'électrophorèse capillaire de zone

A.1 Principe et grandeurs fondamentales

L'électrophorèse capillaire de zone est une technique d'analyse permettant la séparation des composés ioniques ou ionisables par différence de vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique. La séparation des analytes est contrôlée par deux mécanismes de transport : l'électromigration et l'électroosmose.

A.1.2 Electromigration

L'électromigration (ou migration électrophorétique) résulte du déplacement d'une espèce présentant une charge lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. La vitesse électrophorétique dépend alors du champ électrique et de la mobilité électrophorétique de l'espèce chargée selon l'équation (1) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1)$$

où v_{ep} est la vitesse électrophorétique (m s^{-1}), E le champ électrique (V m^{-1}) et μ_{ep} la mobilité électrophorétique ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). La migration électrophorétique s'effectue dans le sens du champ électrique pour les ions chargés positivement et dans le sens contraire pour les ions chargés négativement.

La mobilité électrophorétique d'un ion dépend de sa charge et de sa taille selon l'équation de Stokes (petits ions sphériques, indéformables et imperméables au solvant) (2) :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (2)$$

avec μ_{ep} la mobilité électrophorétique, q la charge de l'ion, η la viscosité du solvant et R le rayon hydrodynamique de l'ion solvaté.

Une espèce chargée sera donc d'autant plus mobile que sa charge sera élevée et que son rayon hydrodynamique sera faible.

Expérimentalement, la mobilité électrophorétique d'une espèce dépend du pH, de la force ionique de l'électrolyte, de la présence d'espèces complexantes dans l'électrolyte, de la température et de la nature et de la teneur en solvant dans l'électrolyte.

A.1.2 Electrosmose

L'électrosmose correspond à l'écoulement d'un fluide remplissant un capillaire dont la paroi interne possède une charge de surface lorsqu'on applique un champ électrique.

Dans le cas d'un capillaire de silice, la déprotonation des fonctions silanol lorsque le pH est supérieur à 2 conduit à la formation d'une paroi interne chargée négativement. En présence d'un électrolyte dans le capillaire, les cations de l'électrolyte sont attirés par la présence de charges négatives sur la paroi du capillaire et forment par interactions électrostatiques une double couche électrique (Figure A-1) qui se caractérise par un potentiel zéta (ζ). Ce potentiel peut être défini selon l'équation (3)

$$\zeta = \frac{\delta \sigma}{\varepsilon} \quad (3)$$

avec δ : l'épaisseur de la double couche, σ : la densité de charge par unité de surface au plan de cisaillement (voir Figure A-1) et ε : la constante diélectrique du milieu.

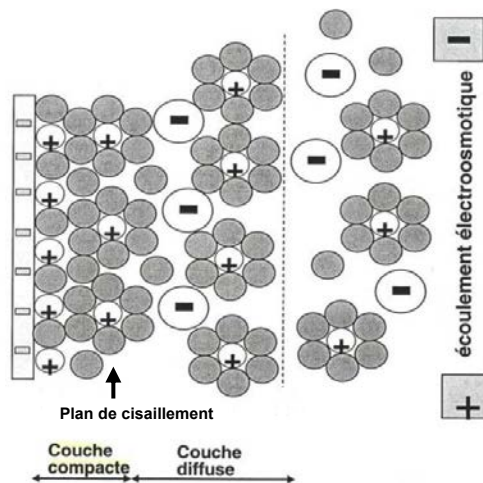


Figure A-1: Schéma de la double couche électrique à l'interface silice-électrolyte

Ainsi en appliquant un champ électrique tangentiel à l'interface silice/électrolyte, les cations présentant une charge opposée à celle de la surface du capillaire et présents en excès dans la couche diffuse migrent vers la cathode et entraînent avec eux toutes les espèces présentes dans le capillaire. Cet écoulement est appelé électrosmose. La vitesse linéaire de cet écoulement est proportionnelle au champ électrique et à la mobilité électroosmotique :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (4)$$

La mobilité électroosmotique (μ_{eo}) peut alors s'exprimer par :

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \epsilon}{\eta} \quad (5)$$

avec η : la viscosité du liquide dans la couche diffuse.

L'écoulement électroosmotique dépend de plusieurs paramètres tels que le potentiel zéta, la viscosité et la constante diélectrique de l'électrolyte. Le sens de l'écoulement électroosmotique dépend du signe de la charge à la surface du capillaire. De plus, le taux d'ionisation des groupements silanol qui définit la densité de charge à la surface du capillaire dépend du pH de l'électrolyte. Le potentiel zéta dépend de la force ionique et de la nature des cations de l'électrolyte. Enfin, l'écoulement électroosmotique peut être modifié par la présence de solvants organiques dans l'électrolyte qui influencent la viscosité, le potentiel zéta et la constante diélectrique. L'écoulement électroosmotique présente un profil de vitesse plat, donc non-dispersif, permettant d'obtenir des efficacités de pics supérieures à celles obtenues en chromatographie en phase liquide.

Cet écoulement peut être modifié ou inversé en ajoutant dans l'électrolyte des petits ions, des tensioactifs ou des polymères qui interagissent avec les groupements silanol et qui pourront permettre de limiter l'adsorption des analytes sur la paroi du capillaire. L'ajout de ces additifs permettra de diminuer les temps d'analyse ou d'améliorer la résolution par exemple. Il est également possible de supprimer l'écoulement électroosmotique en utilisant des capillaires modifiés ou greffés chimiquement, qui permettront également de limiter l'adsorption des analytes sur la paroi du capillaire. Ils sont souvent utilisés pour l'analyse de composés basiques ou de protéines.

A.2 L'électrophorèse capillaire de zone

A.2.1 Principe de séparation

Parmi les différents modes de séparation, l'électrophorèse capillaire de zone est le mode de séparation le plus simple à mettre en œuvre et donc le plus utilisé. En électrophorèse capillaire de zone, les analytes sont séparés dans un capillaire rempli d'un électrolyte unique, ayant un pH et une force ionique donnée. Les différentes espèces sont transportées dans le capillaire à une vitesse apparente, qui correspond à la somme algébrique de la vitesse électrophorétique de l'espèce et de la vitesse de l'écoulement électroosmotique (Figure A-2).

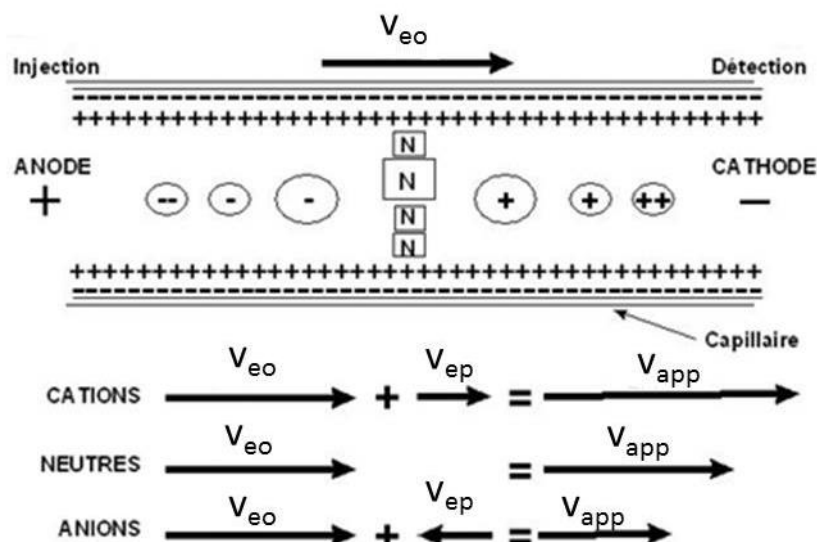


Figure A-2: Schéma de principe du transport des espèces en électrophorèse capillaire de zone

Dans le cas présenté en Figure A-2, l'échantillon est injecté du côté anodique dans un capillaire en silice vierge non modifié et une tension positive à l'entrée du capillaire est appliquée. En ce qui concerne les cations, les mobilités électrophorétiques et électroosmotique étant de même signe, ils migrent donc rapidement vers le détecteur. Dans le cas des anions, les mobilités électrophorétiques et électroosmotique étant de signes contraires, ils ne pourront migrer vers le détecteur que si leurs mobilités électrophorétiques sont inférieures (en valeur absolue) à la mobilité électroosmotique. Ils présenteront donc des temps de migration plus élevés que les cations. Ces espèces (cations et anions) seront séparées en fonction de leurs différences de mobilités électrophorétiques. Pour les molécules neutres, elles migreront toutes à la vitesse de l'écoulement électroosmotique et, par conséquent, elles ne seront pas séparées entre elles. Le temps de migration de ces espèces sera compris entre celui des espèces cationiques et celui des espèces anioniques. Les espèces neutres peuvent être séparées entre elles en leur apportant *in situ* une charge apparente, soit par complexation, soit en les incorporant dans des micelles.

La mobilité apparente des différentes espèces peut être calculée à partir de la relation suivante :

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo} = \frac{L_T L_D}{V t_M} \quad (6)$$

avec t_M , le temps de migration (s) ; V , la tension appliquée (V), L_T , la longueur totale du capillaire (m); L_D , la longueur effective du capillaire (m) et μ_{app} : la mobilité apparente ($m^2 V^{-1} s^{-1}$).

A.2.2 Paramètres d'optimisation d'une séparation

En électrophorèse capillaire de zone, les principaux paramètres permettant d'optimiser une séparation sont liés à la composition de l'électrolyte (pH, force ionique, nature et teneur en solvant). Le pH de l'électrolyte est un paramètre important car il permet de contrôler le degré d'ionisation des analytes et l'amplitude de l'écoulement électroosmotique. La force ionique de l'électrolyte influence également l'écoulement électroosmotique et la mobilité électrophorétique des espèces. L'ajout d'un solvant organique peut dans certains cas permettre d'améliorer la solubilité des analytes et la sélectivité. La température, la longueur du capillaire et la tension de séparation sont des paramètres d'optimisation secondaires, impactant essentiellement la durée des analyses.

A.2.3 La détection en électrophorèse capillaire

Tous les appareils d'électrophorèse capillaire commerciaux sont équipés de détecteurs de spectrophotométrie d'absorbance UV. La détection des composés est réalisée directement à travers le capillaire au niveau d'une fenêtre de détection obtenue dans la plupart des cas après combustion de la gaine extérieure en polyimide du capillaire. A cause de la faible longueur du chemin optique (environ le diamètre du capillaire), des problèmes de sensibilité sont souvent rencontrés. Pour augmenter la sensibilité de la détection, des capillaires présentant un renflement (ou bulle) ou une cellule de détection en forme de Z peuvent être utilisés. Deux méthodes de détection peuvent alors être envisagées :

- la détection directe des composés présentant un chromophore
- la détection indirecte réalisée sans modification de l'appareillage par ajout dans l'électrolyte d'une espèce ionique de même signe de charge que les analytes, présentant un chromophore et ayant une mobilité électrophorétique du même ordre de grandeur que les analytes.

La conductimétrie est un autre mode de détection utilisé en électrophorèse capillaire car elle permet la détection de toutes les espèces chargées et peut donc être considérée comme universelle. Ce mode de détection, complémentaire de la détection par absorbance, ne requiert pas la présence d'un groupement chromophore sur les composés à détecter. D'autres modes de détection sont disponibles commercialement tels que la fluorescence et la spectrométrie de masse. Enfin, la détection électrochimique peut être envisagée, mais elle n'est pas disponible commercialement.

A.2.4 Mise en œuvre expérimentale

La figure A-3 présente le schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire. Ces appareils sont constitués d'un capillaire où a lieu la séparation, dont les extrémités sont immergées dans des flacons

contenant l'électrolyte de séparation, de 2 électrodes plongeant dans ces flacons et alimentées par un générateur de haute tension, d'un système d'injection des échantillons et d'un système de détection.

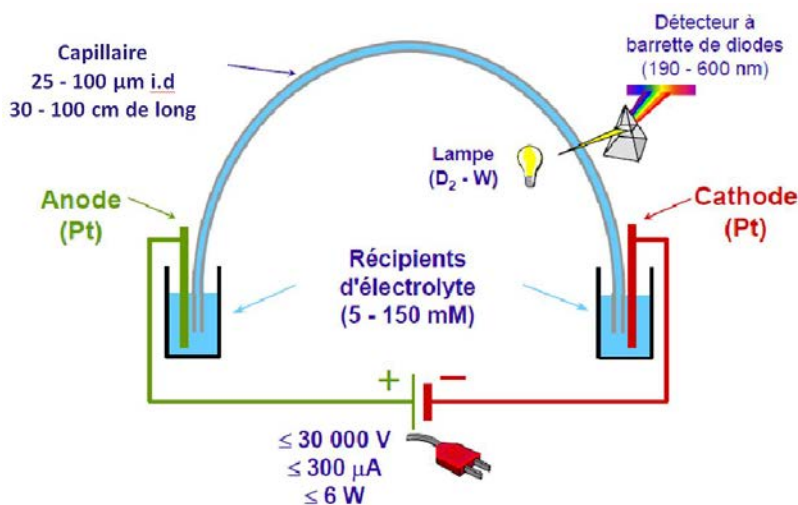


Figure A-3: Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire

Les capillaires utilisés sont constitués de silice et revêtus d'une couche de polyimide ou d'un polymère perfluoré transparent dans l'UV, afin d'assurer leur résistance mécanique. Ces capillaires présentent des longueurs comprises entre 30 et 100 cm et des diamètres internes compris entre 25 et 100 µm.

Deux modes d'injection sont classiquement utilisés en électrophorèse capillaire :

- l'injection hydrodynamique : ce mode d'injection consiste à plonger une des extrémités du capillaire dans un flacon contenant l'échantillon puis à imposer une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire, par surpression à l'entrée du capillaire ou dépression à la sortie. Le volume d'échantillon injecté dépend ainsi de la pression appliquée, du temps d'application de cette pression, de la viscosité de l'échantillon et de l'électrolyte présent dans le capillaire et des dimensions du capillaire de séparation.




- l'injection électrocinétique : ce mode d'injection consiste à appliquer une tension permettant d'introduire les composés par migration électrophorétique et écoulement électroosmotique. De ce fait, tous les solutés ionisés ne seront pas injectés dans les mêmes proportions, à cause de leurs différences de vitesses de migration. Ainsi, les composés ayant une mobilité apparente plus grande seront injectés en plus grande proportion qu'un composé ayant une faible mobilité apparente. La quantité injectée dépend dans ce cas de la tension et de sa durée d'application, de la mobilité électrophorétique des composés et de la mobilité électroosmotique.

ANNEXE B : Consignes de sécurité liées à la manipulation de nitrocellulose

Nom chimique de la préparation présentant un danger : nitrocellulose (nitrate de cellulose) de taux d'azote >12,6 %, mouillée avec de l'eau

La nitrocellulose à taux d'azote >12,6 % est un produit très énergétique et doit être manipulée avec précautions.

RISQUES

	<p>Explosif</p> <p>Explosif à l'état sec</p> <p>Grand risque d'explosion par choc, friction, feu ou autres sources d'ignition</p>
 	<p>Matière hautement inflammable</p>




Moyens d'extinction en cas d'incendie :

- Uniquement de l'eau en grande quantité
- Ne pas utiliser : dioxyde de carbone, mousse, poudre polyvalente et sable
- Les moyens d'extinction de type étouffant ne sont pas efficaces car la nitrocellulose contient de l'oxygène

MANIPULATION ET STOCKAGE

Manipulation :

- Manipuler les emballages avec précaution : ne pas lâcher, faire glisser, faire rouler ou heurter les emballages
- Tenir le produit à l'écart des flammes et de la chaleur
- Eviter les étincelles, l'électricité statique, les heurts et les frottements
- Ne pas laisser sécher la nitrocellulose
- S'assurer de la ventilation adéquate
- Porter des vêtements de protection antistatiques selon la norme EN 1149
- Utiliser des outils de manipulation en matériaux non ferreux tels le cuivre, le laiton, le bois...
- Définir un périmètre de sécurité
- Maintenir l'espace de manipulation parfaitement propre.

	Manipuler sous Sorbonne vitre baissée
	Manipuler avec des lunettes de protection
	Manipuler avec des gants antistatiques

Stockage :

- Stocker dans des récipients étanches, dans un endroit frais et bien ventilé
- Tenir à l'écart de la chaleur, des flammes ou de toute autre source d'inflammation
- Protéger de la lumière solaire directe
- Matières incompatibles : alcalis, produits acides, amines ou agents oxydants
- Ne pas stocker des quantités de nitrocellulose supérieures au besoin
- S'assurer que l'agent mouillant est régulièrement réparti dans tout le produit

Développement de nouvelles stratégies utilisant l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico-chimique des nitrocelluloses en vue de leur identification dans des prélèvements pré- ou post-attentat

La nitrocellulose (NC) est un ester nitrique de cellulose dont le taux de nitration détermine ses propriétés physiques et chimiques ainsi que ses applications industrielles. En effet, les NC ayant des taux de nitration inférieurs à 12,5% sont utilisées dans des produits courants (encres, peintures, vernis et membranes) alors que les NC présentant des taux de nitration supérieurs à 12,5% sont utilisées dans la fabrication de produits explosifs (dynamites et poudres propulsives). Il est donc nécessaire du point de vue forensique de disposer de méthodes permettant d'une part, d'identifier la présence de NC, d'autre part, de les discriminer. Les méthodes existantes sont très anciennes, lourdes, voire dangereuses, quand elles ne font pas totalement défaut. Par conséquent, il y a un réel besoin de disposer de méthodes plus modernes, moins lourdes et plus sûres, permettant d'identifier la présence de NC et de les discriminer. Dans une première partie, le rendement de dénitrification des NC obtenu après hydrolyse alcaline a été optimisé à l'aide d'un plan d'expériences. Les ions nitrite et nitrate libérés après hydrolyse ont été quantifiés par électrophorèse capillaire (CE). Ensuite, une nouvelle méthode permettant de déterminer le taux de nitration des NC a été développée. Cette méthode est basée sur une relation linéaire entre le ratio molaire des concentrations en ions nitrite et nitrate libérés et le taux de nitration de la NC. Ces différentes méthodes ont été appliquées avec succès à l'analyse de NC contenues dans différentes matrices. Dans une seconde partie, les produits obtenus après dépolymérisation en milieu acide de la NC ont été étudiés dans l'objectif d'obtenir une empreinte électrophorétique présentant un intérêt forensique. Pour cela, les produits de dépolymérisation acide partielle de la NC ont été dérivés par le 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS), détectés par fluorescence induite par laser, puis identifiés à l'aide d'étalons de cellodextrines, eux-mêmes dérivés par l'APTS. Les produits de dépolymérisation de la NC pourront également être analysés par une nouvelle méthode électrophorétique utilisant un électrolyte très basique avec une détection UV directe impliquant une réaction de photo-oxydation dans la fenêtre de détection. Enfin, la miniaturisation et l'automatisation de l'instrumentation de la CE a été mise à profit afin de déterminer les viscosités intrinsèques d'échantillons de NC. Après avoir déterminé les paramètres de la relation de Mark-Houwink, les masses moléculaires moyennes en poids d'échantillons de NC pourront être déterminées.

Mots clés : *nitrocellulose, électrophorèse capillaire, plan d'expériences, explosifs, carbohydrates, cellodextrines*

New strategies for the physico-chemical characterization of nitrocellulose employing capillary electrophoresis in view of their identification in pre or post-blast residues

Nitrocellulose (NC) is a nitrate cellulose ester polymer whose nitrogen content determines its physical and chemical properties, and its industrial applications. Indeed, NCs with a nitrogen content less than 12.5% are widely used as raw material in daily use products (printing inks, paints, lacquers, varnishes and filter membranes), whereas highly-nitrated NCs (nitrogen content > 12.5%) are employed in the manufacturing of explosive materials (smokeless gunpowders and dynamites). Therefore, and also for regulation reasons, methods for the determination of nitrogen content in NCs are needed, and there is a strong need in developing more modern, simpler, faster, and safer methods. In a first part, the denitration yield obtained after alkaline hydrolysis of NCs was optimized by means of an experimental design. Capillary electrophoresis (CE) was used to follow the reaction through the quantitation of nitrite and nitrate ions released during hydrolysis. Then, a new method to determine the nitrogen content of NCs, based on a linear relationship between it and the molar ratio of nitrite to nitrate ions released after alkaline hydrolysis was developed. These methods were successfully applied to various explosive and non-explosive NC-containing samples. The second part aimed at studying the products obtained after partial acid depolymerization in an attempt to generate a mixture of oligosaccharides retaining information on the initial NC sample and/or the cellulose used to prepare it, which would be of forensic interest. To this end, NC fingerprinting was achieved by CE with laser induced fluorescence detection (LIF) after acid depolymerization, and derivatization with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS). The resulting derivatized oligomers were identified using APTS-derivatized cellodextrin standards. These depolymerization products can also be analyzed with a new CE method with a high-alkaline background electrolyte containing sodium chloride and detection was performed by mid-UV absorbance after photo-oxidation in the detection window. Finally, the advantages of CE instrumentation (miniaturization of the assay and automation) were used to determine the intrinsic viscosity of various NC samples. Thanks to the calculation of Mark Houwink parameters, the weight-average molecular weight of unknown NC samples could be determined.

Keywords: *nitrocellulose, capillary electrophoresis, design of experiments, explosives, carbohydrates, cellodextrins*